

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.  
**EINWIRKUNG VON NUCLEINSÄUREN UND IHREN  
 BAUSTOFFEN AUF DIE WURZELSPITZENMITOSE\*.**

Von  
**EBERHARD WOLL.**

Mit 34 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. August 1952.)

Inhalt.	Seite
A. Einleitung . . . . .	391
B. Material und Methode . . . . .	392
C. Experimenteller Teil . . . . .	394
I. Teilungsintensität, Stadienverteilung und morphologisches Verhalten	395
a) Versuche mit <i>Vicia</i> bei Verwendung der Carminessigsäure-Färbung	395
1. Vergleich verschiedener Konzentrationen . . . . .	395
2. Vergleich verschiedener Stoffe . . . . .	402
b) Kontrollversuche mit <i>Vicia</i> unter Anwendung der Nuclealreaktion	406
c) Versuche mit <i>Impatiens</i> . . . . .	407
II. Chromosomale Mutationen . . . . .	408
D. Diskussion . . . . .	410
I. Zur Fragestellung . . . . .	411
II. Diskussion der Versuchsergebnisse . . . . .	414
a) Anomalien in Teilungsrate und Zellmorphologie . . . . .	414
b) Chromosomale Mutationen . . . . .	419
III. Mögliche Folgerungen aus den Ergebnissen . . . . .	420
IV. Sonstige Fragen . . . . .	422
a) Paarung im Eu- und Heterochromatin . . . . .	422
b) Vergleich der Empfindlichkeit von <i>Vicia</i> und <i>Impatiens</i> . . . . .	423
c) Zur Nuclealreaktion . . . . .	423
Zusammenfassung . . . . .	424
Literatur . . . . .	425

**A. Einleitung.**

Seit OEHLKERS (1943 und 1946) mit Äthylurethan bei *Oenothera* und AUERBACH (1943) mit Senfgas bei *Drosophila* eine Erhöhung der spontanen Mutationsrate erzielt haben, fehlt es nicht an Arbeiten, die die Einwirkung der verschiedensten Chemikalien auf die Kernteilung untersuchen. Es kamen meist zellfremde Stoffe zur Anwendung, von denen man sich eine mutagene Wirkung versprach. Die von ihnen ausgelösten Anomalien wurden beschrieben und ihr Angriffsmechanismus diskutiert (so z. B. LEVAN 1944, ÖSTERGREN 1944, DARLINGTON und KOLLER 1947,

\* Auszug einer Dissertation der nat.-math. Fakultät der Universität Freiburg i. Br. Herrn Prof. Dr. F. OEHLKERS danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung meiner Arbeiten, Frau Prof. Dr. C. HARTE für ihre Hilfsbereitschaft.

FORD 1948, DIETZEL 1949, HOHL 1949, KIHLMAN 1949, LEVAN und LOTFY 1949, LOVELESS und REVELL 1949 und 1950, DEUFEL 1951, KIHLMAN und LEVAN 1951). Erst in den letzten Jahren applizierte man auch Stoffe, die natürlicherweise in den Zellen vorkommen (MARQUARDT 1949, KIHLMAN 1950).

Seit Jahrzehnten wird an der Strukturaufklärung der Nucleinsäuren von chemischer und biochemischer Seite aus gearbeitet (vgl. GULLAND 1951). Durch die Untersuchungen der CASPERSSON-Schule (vgl. die bei CASPERSSON 1950 zitierten Arbeiten) ist die entscheidende Bedeutung der Nucleinsäuren im Zellgeschehen erkannt worden. Es lag nahe, die Nucleinsäuren und ihre Bausteine auf die Zellteilung einwirken zu lassen. Die Auswahl der einzelnen Stoffe wurde bestimmt teils von theoretischen Erwägungen, teils davon, welche Stoffe erreichbar waren. Außerdem kamen einige hypothetische Vorstufen zur Anwendung.

### B. Material und Methode.

Für die Untersuchungen wurden *Vicia faba* ( $2n = 12$ ) als vorwiegend euchromatisches Objekt und *Impatiens balsamina* ( $2n = 14$ ) als stark heterochromatisches Objekt verwendet. Die Versuche wurden im Februar und März 1950 sowie März, September und November 1951 in einem wärmeisolierten Raum des Freiburger Institutes durchgeführt. Seine Nordlage gewährt eine gleichmäßige Beleuchtung durch Tageslicht. Die Temperatur schwankte nur um  $0,5^\circ\text{C}$ , und zwar bei  $23^\circ$  bzw. bei  $20^\circ\text{C}$ .

Die *Vicia*-Samen wurden in Wasser angekeimt. Am 3. Tage wurden sie in Sägespäne eingetopft, die mit Knopscher Nährlösung getränkt waren. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Pflanzen in verdunkelte  $100\text{ cm}^3$ -Erlenmeyerkolben umgesetzt. [LEVAN und LOTFY (1950) haben festgestellt, daß sich durch die Ankeimung in Wasser verursachte Anomalien nach 7 Tagen verlieren.] Je nach Versuchsreihe blieben die Pflanzen erst noch 24 Std in reiner Nährlösung, oder aber der Versuch schloß sich unmittelbar an die Sägespänekultur an.

Die Samen von *Impatiens* wurden in Petrischalen auf einem doppelten Filterpapier von SCHLEICHER und SCHÜLL in Wasser angekeimt. Nach 6 Tagen wurde das Wasser durch Nährlösung ersetzt; nach weiteren 4 Tagen diese gegen die Versuchslösungen ausgetauscht.

Die Glasgefäße waren mit Chromschwefelsäure gereinigt und anschließend 12mal ausgespült. Zur Nährlösung fand über Jenaer Glas destilliertes Wasser Verwendung.

#### Zusammensetzung der Nährlösung:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,00 g	} auf $1000\text{ cm}^3$ Wasser (Knop).
$\text{KNO}_3$	0,25 g	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,25 g	
$\text{MgSO}_4$	0,25 g	
$\text{FeSO}_4$	Spur	

Dazu  $1\text{ cm}^3$  der folgenden Lösung der Spurenelemente (FINK 1950):

$\text{ZnSO}_4$	0,05 g	} auf $1000\text{ cm}^3$ Wasser.
$\text{CuSO}_4$	0,05 g	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,60 g	
$\text{MnCl}_2$	0,30 g	

Die Stoffe, deren Wirkung zu untersuchen war, wurden in der Nährlösung aufgelöst, zum Teil unter leichtem Erwärmen. Einige Versuchslösungen wichen von dem  $p_H$  der reinen Knopschen Nährlösung, die stets für die Kontrollen Verwendung fand, stärker ab. Ihr  $p_H$  wurde durch Zugabe von HCl bzw. NaOH diesem genähert. In der Tabelle 1 sind die verwendeten Stoffe und ihre Konzentration angeführt, sowie die Methode, mit der sie in Lösung gebracht wurden. Ferner ist vermerkt, ob die Azidität der Lösung geändert wurde und womit, der  $p_H$ -Wert bei Versuchsbeginn und die Herkunft des Stoffes. Die letzten Spalten zeigen, welche Lösungen den beiden Testpflanzen appliziert wurden, und nach welcher Einwirkungszeit fixiert wurde.

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, bewegen sich die  $p_H$ -Werte zwischen 5,0 und 6,6. Nach den Ergebnissen von FINK (1947) und KEYSNER (1931) sind die geringen Unterschiede im Säuregrad der Kulturflüssigkeit innerhalb dieses Intervalls in ihrer Auswirkung auf die Verhältnisse der Zellteilung praktisch unbedeutend. „Das Wachstum der Wurzeln von *Vicia faba* ist optimal im leicht sauren Medium  $p_H = 6$ “ (FINK). Da nur Versuchslösungen einen  $p_H$ -Wert um 6 aufweisen und diese in fast allen Fällen eine deutliche Wachstumshemmung herbeiführen, ist ihre Wirkung keinesfalls eine Funktion des von der Kontrolle um ein Geringes abweichenden Säuregrades. Das untersuchte Material darf also auch bezüglich eines möglichen Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration als homogen betrachtet werden.

Von *Vicia* wurden jeweils die Hauptwurzeln fixiert; von *Impatiens* Nebenwurzeln, weil hier die Hauptwurzel ihr Wachstum sehr bald einstellt. Zur Fixierung und gleichzeitigen Färbung fand ein modifiziertes Ernstsches Gemisch Verwendung: Carnoy (3 Teile Alkohol und 1 Teil Eisessig) zu Essigsäurekarmin im Verhältnis 2,5:1 (DEUFFEL 1951).

Die mikroskopische Auswertung geschah an Hand von Quetschpräparaten. Die Wirkung aller Stoffe und Konzentrationen (außer dem 4% Na-Ribonucleat) wurde an *Vicia*-Wurzelspitzen morphologisch, sowie bezüglich der Teilungsintensität und der Stadienverteilung quantitativ-statistisch getestet. Je Versuchsreihe und Fixierungszeit wurden hierzu 10 Wurzelspitzen herangezogen. Eine Durchzählung von jeweils 200 Zellen aus der Zone der größten Teilungsdichte ergab den Prozentsatz der Mitosehäufigkeit, eine Auswertung von jeweils 100 in Teilung befindlichen Kernen die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Stadien. Zur Analyse chromosomaler Mutationen sind die Metaphasen am geeignetsten. Es wurden hierzu jeweils alle Metaphasen eines Präparates herangezogen. Anomalien sind mit Sicherheit naturgemäß nur in solchen Zellen zu konstatieren, deren gesamten Chromosomenbestand man klar identifizieren kann. Nur diese werden später als auswertbar bezeichnet. Die Einwirkung des 4%-Hefenucleates wurde nur morphologisch ausgewertet. Ebenfalls nur morphologisch getestet wurden die Versuche mit *Impatiens balsamina* sowie die Kontrollversuche mit *Vicia* unter Anwendung der Feulgenschen Nuclealreaktion.

Zur Durchführung der Nuclealreaktion wurde in Flemming-Heitz (= starker Flemming ohne Zusatz von Essigsäure) 48 Std fixiert, in nHCl bei 60° C 25 min hydrolysiert und 2 Std 30 min in dem Schiffschen Reagens gefärbt (vgl. BAUER 1932). Ein Aufenthalt der Wurzelspitzen in Wasser intensiviert die Färbung, jedoch darf er sich nicht über mehr als 24 Std ausdehnen, da sonst die Objekte zu hart werden. Man quetscht am besten in 50% Essigsäure ohne Erwärmen.

Optik: Ortholux von Ernst Leitz, Wetzlar.

Die Veränderungen in der Teilungshäufigkeit wurden mit der Streuungsanalyse im Anschluß an POST (1946) statistisch gesichert. Die sogenannten Endanalysen sind jeweils in der Arbeit angeführt (Tabelle 2, 3 und 4). Ist die Größe  $F$  berechnet/ $F$  Grenzwert  $\geq 1$ , so kann die Wirkung des betreffenden Faktors als gesichert

Tabelle 1. Einzelheiten der Versuchsdurchführung. (Jeweils eine Zeile)

Stoff	Konzentration	Gelöst	pH verändert mit
Thymonucleinsäure als Na-Salz	0,1 %	in n/10 NaOH; Nährsalze später zugegeben	HCl
Thymonucleinsäure als Na-Salz	0,01 %	0,1 % verdünnt	
Thymonucleinsäure als Na-Salz	0,001 %	0,1 % verdünnt	
Thymonucleinsäure als Na-Salz	0,0001 %	0,1 % verdünnt	
Ribosenucleinsäure als Na-Salz	0,1 %	in n/10 NaOH; Nährsalze später zugegeben	HCl
Ribosenucleinsäure als Na-Salz	4 %	in n/5 NaOH; Nährsalze später zugegeben	HCl
Adenin . . . . .	m/200	unter Erwärmen	—
Adenin . . . . .	m/500	m/200 verdünnt	—
Adenin . . . . .	m/1000	m/200 verdünnt	—
Adenin . . . . .	m/5000	m/200 verdünnt	—
Adenin . . . . .	m/10000	m/200 verdünnt	—
Adenosin (aus Hefe) . . . . .	m/200	kalt	—
Thymin . . . . .	m/200	kalt	—
Uracil . . . . .	m/200	unter Erwärmen	—
l-Histidin (Base) . . . . .	m/200	kalt	HCl
l-Arginin (Base) . . . . .	m/200	kalt	HCl
Harnstoff . . . . .	m/100	kalt	HCl
Malonsäure . . . . .	m/200	kalt	NaOH
Milchsäure . . . . .	m/200	kalt	NaOH
Harnstoff und Malonsäure . . .	m/100 u.	kalt	NaOH
	m/200		
Harnstoff und Milchsäure . . .	m/100 u.	kalt	NaOH
	m/200		

<sup>1</sup> Die abgekürzten Firmenbezeichnungen sind: *Light*: L. Light & Co., Ltd. Organic chemicals. Old Bowry Laboratories; Wraysbury, England. — *H. R.*: Hoffmann-La Roche, Basel. — *L. H.*: Laboratorium Prof. Hesse, Chemisches Institut der Universität Freiburg.

gelten. Die statistische Bearbeitung der Stadienverteilung und des Prozentsatzes der Chromosomenmutationen geschah durch den  $\chi^2$ -Test. *P*-Werte, die kleiner als 0,05 sind, gelten als „gesichert“; solche, die kleiner als 0,01 sind, als „gut gesichert“.

### C. Experimenteller Teil.

Um eine Übersicht über die vielfältigen Ergebnisse zu gewinnen, erschien es zweckmäßig, die einzelnen Phänomene tunlich zusammenzufassen, typische Beispiele für gewisse Reaktionsnormen herauszugreifen und ausführlicher zur Darstellung zu bringen. Ein solches Verfahren erlaubt dann an anderen Stellen eine mehr summarische Behandlung der Versuchsergebnisse. Entsprechend sollen die experimentellen Befunde über Chromosomenmutationen gemeinsam im Anschluß an die anderen Ergebnisse der Versuchsreihen dargetan werden.



bezieht sich auf den Versuch mit einer Konzentration eines Stoffes.)

pH bei Versuchsbeginn <sup>2</sup>	Herkunft des Stoffes <sup>1</sup>	Testpflanze		Kontrolle mit Feulgen; Stunden der Einwirkung
		<i>Vicia</i> Stunden der Einwirkung	<i>Impatiens</i>	
6,5 6,3 6,5	Light	2, 4, 6, 8, 12, 24, 48	6, 12, 24	6, 8, 24
5,5		2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48		
6,0 6,6 6,0	Light	2, 4, 6, 8, 12, 24	6, 12, 24	6, 8
6,3		2, 4, 8, 12		
5,9 6,0 5,4	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 96 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 96 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 96 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 96		6, 8, 24
5,8		2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 96		
5,2 5,2 5,3	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24	6, 12, 24	6, 8
5,2 5,0	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24		6, 8
5,0	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24		
5,0 5,7 5,9	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24	6, 12, 24	6, 8
6,0 6,0	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24		6, 8
5,2 5,0 5,3	Merck, Darmstadt	2, 4, 6, 8, 12, 24	6, 12, 24	6, 8
5,2 5,3 5,5	L. H.	2, 4, 6, 8, 12, 24	6, 12, 24	6, 8
5,7	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24		
5,2 5,4 5,6	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24	6, 12, 24	6, 8
5,4	H. R.	2, 4, 6, 8, 12, 24		

<sup>2</sup> Die drei Werte für den pH beziehen sich in der angeführten Reihenfolge auf die Azidität der Lösungen für *Vicia*-Versuche und bei Verwendung der Carminessigsäure, Kontrollversuche unter Anwendung von Feulgen-Färbung und *Impatiens*-Versuche.

## I. Teilungsintensität, Stadienverteilung und morphologisches Verhalten.

### a) Versuche mit *Vicia* bei Verwendung der Carminessigsäure-Färbung.

*Vicia faba* ist als cytologisches Objekt besonders in seinem mitotischen Verhalten im Freiburger Institut genauestens bekannt (BRAUER 1949a, b, 1950, 1951; FINK 1950; DEUFEL 1951; RESCH 1951). Bei geeigneter Versuchsanordnung ist eine statistische Bearbeitung der gewonnenen Versuchsdaten gut durchzuführen (HARTE 1950). Die relativ großen Chromosomen und Zellen erlauben auch eine ins einzelne gehende morphologische Auswertung.

## 1. Vergleich verschiedener Konzentrationen.

### α) Adenin.

Adenin kam in 5 Konzentrationen zur Einwirkung (vgl. Tabelle 1), deren stärkste durch die Löslichkeit dieses Purinkörpers in Wasser bestimmt ist. Um

die Wirkung verschiedener Stoffe miteinander vergleichen zu können, war es notwendig, diese Molarität überall dort beizubehalten, wo ein Molekulargewicht bekannt ist.

Makroskopisch weisen die Pflanzen in den schwächeren Versuchslösungen kaum Differenzen auf zu denen der Kontrolle. In den beiden stärkeren Konzentrationen sind sie jedoch im Wachstum stark gehemmt und bilden kaum Seitenwurzeln aus.

Diese Beobachtung wird durch mikroskopische Befunde bestätigt und erweitert. Den Verlauf der Teilungsintensität zeigt Abb. 1: Die Pflanzen scheinen auf den Schock der Umsetzung in den ersten Stunden mit einer vorübergehenden Schwankung zu reagieren. Insgesamt ist die Teilungstätigkeit in den Versuchslösungen gehemmt gegenüber der Kontrolle, und zwar im allgemeinen um so mehr,

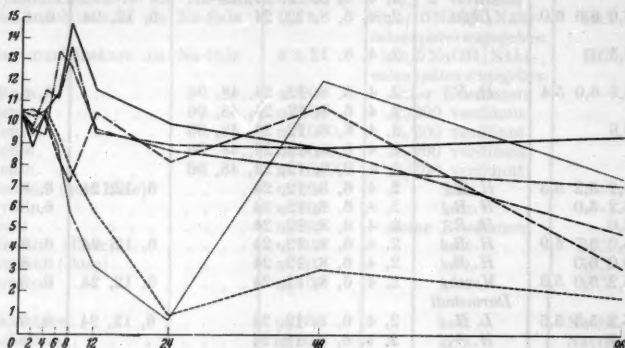


Abb. 1. Adeninwirkung auf *Vicia faba*. Ordinate: Teilungshäufigkeit in Prozent. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, — m/10000, — m/5000, — m/1000, — m/500, — m/200.

je stärker die Konzentration ist. Ein bemerkenswerter Abfall der Teilungsintensität zeigt sich bei den 3 stärkeren Konzentrationen: m/1000 bewirkt zunächst eine Herabsetzung, dann setzt eine vorübergehende Erholung der Pflanzen ein; nach 2 Tagen läßt jedoch die Teilungsintensität wieder nach. Bei m/500 ist der anfängliche Abfall wesentlich stärker gemäß der höheren Konzentration, die Erholung später, aber recht gründlich; schließlich fällt auch hier die Teilungsrate wieder ab. Im Grundsätzlichen haben wir bei m/200 denselben Verlauf, jedoch ist die Erholung nur eine relativ geringe. Die Differenzen zwischen den beiden geringsten Konzen-

Tabelle 2. Endanalyse zum Adenin-Versuch. Teilungshäufigkeit.

Variationsursache	Quadrat der Abwei- chungen	Frei- heits- grade	Var- ianz	F berech- net	F Grenzwert		F berechnet F Grenzwert	
					0,05	0,01	0,05	0,01
Zeiten . . . . .	6217	7	888	35	2,25	3,12	15,56	11,22
Zeiten × Wiederholungen . . . . .	1547	63	25					
Konzentrationen . . . . .	4608	5	922	26	2,45	3,51	10,61	7,4
Konzentrationen × Wiederholungen . . . . .	1582	45	35					
Konzentrationen × Zeiten . . . . .	8693	35	248	8	1,52	1,79	5,26	4,47
Konzentrationen × Zeiten × Wieder- holungen . . . . .	9734	315	31					

trationen und der Kontrolle sind nicht gesichert. Die anderen sind alle gesichert bzw. gut gesichert. Die Wirkung der Stoffe ist gut gesichert von der Zeit abhängig.

Die Beurteilung des mitotischen Verhaltens eines Objektes lediglich auf Grund der Anzahl der in Teilung befindlichen Kerne kann zu falschen Schlüssen führen. So muß ein höherer Mitoseprozentsatz nicht unbedingt Folge höherer Teilungsintensität sein, sondern kann auch durch den verzögerten Ablauf einzelner Stadien zustande kommen. Deshalb wurden stets auch die prozentualen Anteile der verschiedenen Teilungsstadien an der Gesamtzahl der Mitosen ermittelt, wenn dies auch im einzelnen nicht immer dargestellt ist.

Abb. 2 zeigt die Stadienverteilung für die beiden stärksten Konzentrationen von Adenin. (Die Stadienverteilung der schwachen Lösungen weicht nicht wesentlich von der der Kontrolle ab.) Wegen zu geringer Teilungsintensität war nach 12 Std eine Auszählung  $N$  von 100 Teilungsstadien lange nicht mehr überall möglich. Die Kurve zeigt deshalb nur Werte bis zu dieser Zeit. Die Stadien der Fixierungszeiten mit ganz geringer Mitosehäufigkeit sind vorwiegend Prophasen. Die Zahlen für Anaphasen und Telophasen sind hier, wie auch in den anderen Versuchen, weggelassen; sie sind statistisch zu klein und würden zudem die Übersichtlichkeit stören<sup>1</sup>. Die Kurven lassen erkennen: nach anfänglichem Anwachsen der Prophasezahlen und entsprechendem Rückgang der Metaphasen nehmen ab 4 Std jeweils umgekehrt die Metaphasen auf Kosten der Prophasen zu. Bei m/200 ist das stärker ausgeprägt als bei m/500.

Diese Erscheinung findet ihre Erklärung bei der morphologischen Auswertung. Das charakteristische Bild von der Einwirkung des Adenins zeigt m/200 nach 6 Std: Die schlecht quetschbaren Wurzelspitzen sind stärker gefärbt. Ihre Prophasen sind meist überaltert, d. h. die Kerneröffnung ist verzögert, während die Aufspiralisierung der Chromosomen weiterläuft, so daß diese kürzer und dicker werden und Metaphasechromosomen gleichen (Abb. 3). Die Metaphasechromosomen sind

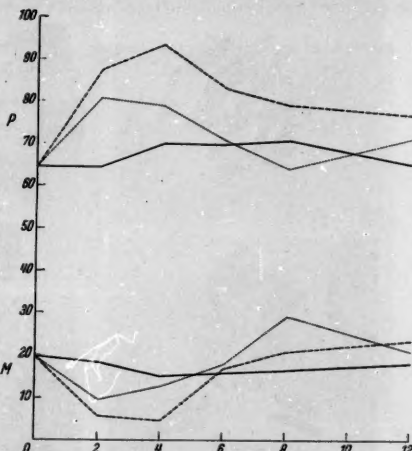


Abb. 2. Adenineinwirkung auf *Vicia faba*. Anteil der Prophasen und Metaphasen an der Stadienverteilung. Ordinate: Prozente der Stadien. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ..... m/500, ..... m/200.

<sup>1</sup> Ein  $\chi^2$ -Test durch Summenvergleich über die 10 Objekte einer Fixierungszeit ließ sich bei der Stadienverteilung nicht in allen Fällen durchführen. Da sich außerdem gezeigt hat, daß man nur die Differenzen sichern konnte, die so beträchtlich sind, daß es einer solchen statistischen Bestätigung nicht bedarf, wurde auf eine Sicherung der Stadienverteilung verzichtet.

stark verkürzt und mit der Carminessigsäure intensiv angefärbt. Nach der Längsteilung der Chromosomen findet augenscheinlich kein Zug an der Insertionsstelle statt. Hieraus ist zu schließen, daß die Spindelbildung unterbleibt. (Die Spindel färbt sich mit den angewandten Methoden nicht an.) Unter 1000 Mitosen findet sich in der Tat auch nur eine Anaphase! Das Ausbleiben der Anaphasebewegung führt zu tetraploiden Metaphasen (Abb. 4 und 5). Bei 6 daraufhin quantitativ ausgewerteten Präparaten sind von 575 Metaphasen 253 tetraploid, d. h. 44%. Es sei

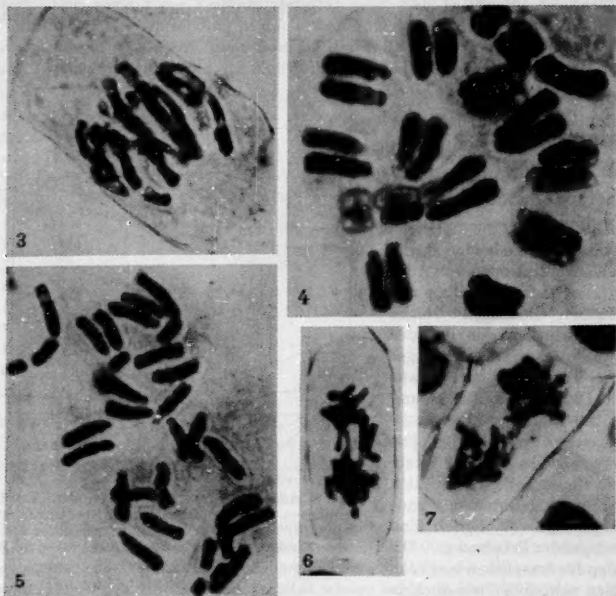


Abb. 3. *Vicia faba*, Adenineinwirkung. Überalterte Prophase. Lage der Chromosomen wie in vorausgegangener Telophase. Carminessigsäure. 1300  $\times$ .

Abb. 4. *Vicia faba*, Adenineinwirkung. C-mitotische Metaphase. Die Schwesterchromosomen gepaart. Carminessigsäure. 1300  $\times$ .

Abb. 5. *Vicia faba*, Adenineinwirkung. C-mitotische Metaphase. Keine Paarung der Schwesterchromosomen. Carminessigsäure. 1300  $\times$ .

Abb. 6. *Vicia faba*, Adenineinwirkung. C-mitotische Metaphase. Versuchte Zweiteilung des Chromosomenbestandes. Carminessigsäure. 900  $\times$ .

Abb. 7. *Vicia faba*, Adenineinwirkung. Restitutionskernbildung aus Metaphase mit versuchter Zweiteilung des Chromosomenbestandes. Carminessigsäure. 900  $\times$ .

eigens betont, daß sie über das ganze Präparat verteilt sind, also nicht das Produkt von Endomitosen in älteren Geweben darstellen. Da der Übergang in die Anaphase unterbleibt, verharren die Chromosomen übernormal lange im Metaphasezustand: Der Anteil der Metaphasen steigt auf Kosten der Prophasen (s. oben). Anscheinend wird zuweilen doch eine Zweiteilung des Chromosomenbestandes versucht, doch gelingt sie nicht (Abb. 6). Die Anzahl der einzelnen Chromosomen in den 2 oder

auch zuweilen 3 Gruppen ist sehr unterschiedlich. Die Konturen der Chromosomen verschwimmen in der Metaphaselage. Es bilden sich Restitutionskerne (Abb. 7).

Nach 8stündiger Einwirkung derselben Konzentration treten die Erscheinungen verstärkt auf. So sind von 480 Metaphasen 242 tetraploid, also 50%. Nach 12 Std finden sich unter 420 Metaphasen 161 tetraploide: immer noch 38%. Nach 24, 48 und 96 Std zeigen die Präparate nur noch ganz wenig Teilungen. Meist sind es stark überalterte Prophasen. Auch tetraploide Metaphasen finden sich noch. Die Restitution zu Ruhekernen erfolgt jetzt nicht nur aus der Metaphase heraus, sondern anscheinend bereits aus der Prophase, also bei nicht eröffnetem Kern. Teilweise finden sich Ruhekern mit mehr als 2 Nucleolen: Polypleide (Abb. 8; vgl. Abb. 9)

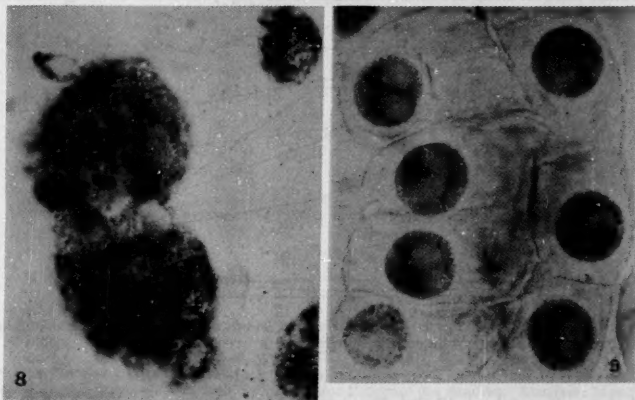


Abb. 8. *Vicia faba*. Adenineinwirkung. Polypleider Ruhekern abnormer Größe mit vielen Nucleolen. Daneben normaler Ruhekern. Carminessigsäure. 1300  $\times$ .

Abb. 9. *Vicia faba*. Normale Ruhekern mit 1 und 2 Nucleolen. Feulgen. 1200  $\times$ .

Die schwächeren Konzentrationen, die im folgenden zusammengefaßt behandelt werden, zeigen die oben beschriebenen Effekte auch, jedoch in bedeutend geringerem Ausmaße. Sie verstärken sich erwartungsgemäß mit steigender Konzentration und zunehmender Dauer der Einwirkung. So zeigt z. B. die 1. Fixierung von m/10000 noch fast das normale Aussehen einer Kontrolle, während sich bei der Fixierung m/500 nach 8 Std bereits die Phänomene feststellen lassen, die für die starken Adeninkonzentrationen typisch sind. (Vgl. entsprechend bei m/500, 8 Std, die Verschiebung der Prophasen-Metaphasenverhältnisse, Abb. 2.) Die Spindelstörung führt in den schwächeren Lösungen meist nicht zum Ausbleiben des Anaphasezuges; sie wird jedoch manifest z. B. in den tripolaren Spindeln und Pseudomitosen. Nach der Telophase unterbleibt nicht selten die Bildung einer neuen Wand. Die beiden Tochterkerne liegen dann in einer einzigen Zelle. Die Umrisse der Kerne sind öfters unregelmäßig gestaltet. — Bei Wiederaufleben der Teilungsintensität, so besonders m/500 nach 48 Std, zeigen die Prophasen erwartungsgemäß überwiegend ein normales Aussehen.

### $\beta$ ) Thymonucleinsäure.

Das Natriumsalz der Thymonucleinsäure kam in 4 Konzentrationen zur Anwendung (vgl. Tabelle 1). Die Lösung war in Übereinstimmung mit BUTLER und

JAMES (1950) kolloidaler Natur. Bereits makroskopisch war ein unterschiedliches Wachstum der Pflanzen in den verschiedenen Lösungen zu konstatieren: in den stärkeren Konzentrationen zeigten sie eine geringere Größenzunahme, in den stärksten bildeten sie im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen kaum Seitenwurzeln aus.

Die hemmende Wirkung, zunehmend mit dem Maße der Konzentration, findet ihren klaren Ausdruck in dem Verlauf der Teilungsintensität der Wurzelspitzen (Abb. 10). In den ersten Stunden des Versuches schwanken die Mittelwerte beträchtlich. Es dürfte das allgemein ein Effekt des Medienwechsels sein. Die beiden schwachen Konzentrationen reagieren mit einer geringen Erhöhung, die stärkste mit einer Herabsetzung der Mitosehäufigkeit. Es folgt jeweils nach 6 Std eine kurze

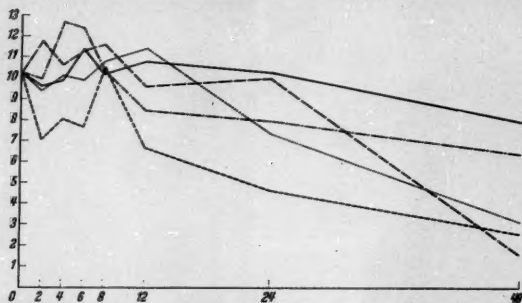


Abb. 10. Einwirkung von Thymonucleinsäure auf *Vicia faba*. Ordinate: Teilungshäufigkeit in Prozent. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ——— 0,0001 %, - - - - - 0,001 %, ..... 0,01 %, - · - · - 0,1 %.

Erholung. Von 8 bzw. 12 Std Einwirkungsdauer ab läßt die Teilungsfrequenz nach, und zwar im allgemeinen um so mehr, je konzentrierter die betreffenden Versuchslösungen sind. Der Unterschied zwischen der 0,1%-Lösung und den anderen Konzentrationen sowie der Kontrolle ist gut gesichert. Die schwächeren Konzentrationen zeigen gut gesicherte Unterschiede fast nur nach 24 Std. Gut gesichert ist auch die Abhängigkeit des Effektes von der Dauer der Einwirkung.

Die Kurve (Abb. 11) zeigt den Verlauf der Stadienverteilung. Die aufgenommenen Mittelwerte stellen einen für den Versuch charakteristischen Ausschnitt dar. Die Häufigkeit der Prophasen in der 0,1%-Lösung nimmt nach 2 Std vorübergehend ab, augenscheinlich auf Kosten der zunehmenden Metaphasenzahl. Die

Tabelle 3. Endanalyse zum Thymonucleinsäure-Versuch. Teilungshäufigkeit.

Variationsursache	Quadrat der Abwei- chungen	Frei- heits- grade	Va- rianz	F berech- net	F Grenzwert		F berechnet	
					0,05	0,01	0,05	0,01
Zeiten . . . . .	5233	6	872	36	2,25	3,12	16,00	11,54
Zeiten × Wiederholungen . . . . .	1271	54	24					
Konzentrationen . . . . .	1976	4	494	11	2,61	3,83	4,21	2,87
Konzentrationen × Wiederholungen . . . . .	1658	36	46					
Konzentrationen × Zeiten . . . . .	2177	24	907	26	1,52	1,79	17,11	14,53
Konzentrationen × Zeiten × Wieder- holungen . . . . .	7480	216	35					



anderen Differenzen sind so gering, daß sie wohl statistische Schwankungen darstellen. Die Präparate von Wurzelspitzen nach längerer und stärkerer Einwirkung zeigen oft eine weit überdurchschnittliche Streuung. Die Stadien der Einwirkungszeiten mit ganz geringer Teilungsfrequenz sind allermeist (stark überalterte) Prophasen. Auch morphologisch hat wieder die stärkste Konzentration die charakteristischste Wirkung. Bereits nach 2stündiger Einwirkung sind die Objekte schlechter quetschbar und stärker angefärbt. Die Prophasen sind öfters überaltert; bei einigen sind die Chromosomen völlig fragmentiert (Abb. 12). Die Metaphasen tendieren zur Verklebung. Ihre Chromosomen sind stark verkürzt und verdickt. Nach 4, 6 und 8 Std Einwirkung zeigen die Präparate ein normaleres Bild: der Anteil

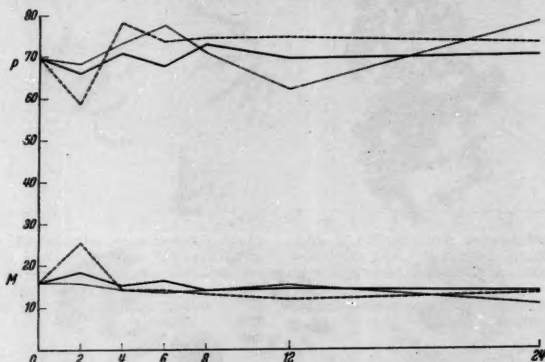


Abb. 11. Einwirkung von Thymonucleinsäure auf *Vicia faba*. Anteil der Prophasen und Metaphasen an der Stadienverteilung. Ordinate: Prozente der Stadien. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ..... 0,01 %, — · — 0,1 %.

der überalterten Prophasen ist zurückgegangen, eine „Zerstückelung“ ihrer Chromosomen findet sich bedeutend seltener. Die Metaphase-Chromosomen sind nicht mehr so stark verkürzt und verdickt. Diese Befunde stimmen mit dem anfänglichen Abfall der Mitosehäufigkeit und deren Wiederanstieg bis zu 8 Std überein.

Weiter in Einklang mit der fortan schnell sinkenden Teilungsfrequenz verstärken sich dann die Anomalien: Die Nucleolen sind oft größer als normal. Sie enthalten zuweilen dunkle Partikel (Abb. 13). Der Anteil der überalterten Prophasen wird groß bis überwiegend. Bei vielen zeigen die Chromosomen eine Gestalt wie in der Metaphase; ihre Umrisse sind jedoch „verschmiert“, und es ist außerdem noch eine diffuse dunkle Kernsubstanz vorhanden (Abb. 14). Die Chromosomen sind stark verkürzt. Zuweilen treten Schwierigkeiten bei der Anaphaseverteilung auf. Es kommt zu Anaphase- und Telophasebrücken, tripolaren Anaphasen und Telophasen. Ausbleiben der Wandbildung nach vollzogener Kernteilung führt zu zweikernigen Zellen. Hin und wieder bilden sich Restitutionskerne aus Metaphasen und Anaphasen. Es werden tetraploide Metaphasen und eine tetraploide Anaphase beobachtet, sowie tetraploide Ruhekerne mit 4 Nucleolen. Die meisten dieser Phänomene finden sich auch zuweilen in den Kontrollen, dort aber ungleich seltener als im Versuch.

Von 5 Fixierungszeiten wurde die Anzahl der Metaphasen überhaupt und die der tetraploiden Metaphasen in Kontrolle und stärkster Konzentration ermittelt. Insgesamt sind bei der Kontrolle von 1869 Metaphasen 9 tetraploid, bei der 0,1%-Lösung

von 1497 immerhin 21. Der Unterschied scheint erheblich zu sein. Die Homogenität der Kontrolle läßt sich aber im Gegensatz zu der des Versuches nicht mit  $\chi^2$  sichern. Ein Vergleich der Einzelwerte der verschiedenen Einwirkungszeiten nach dem Vierer-Tafel-Verfahren erscheint bei der Seltenheit dieser Anomalie (z. B. 2 von 220 nach 24 Std) nicht gerechtfertigt.

Die schwächeren Konzentrationen zeigen dieselben Anomalien. Im Anfang der Einwirkung treten sie aber so gut wie nicht auf, um dann im allgemeinen mit zunehmender Dauer des Versuches und der Konzentration der Lösung zuzunehmen.

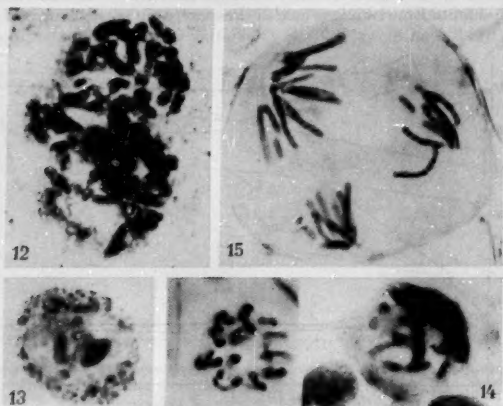


Abb. 12. *Vicia faba*, Thymonucleateinwirkung. Überalterte Prophase mit zerbrochenen Chromosomen. Carminessigsäure. 1560  $\times$ .

Abb. 13. *Vicia faba*, Thymonucleateinwirkung. Ruhekern mit Partikeln in den Nucleolen. Carminessigsäure. 900  $\times$ .

Abb. 14. *Vicia faba*, Thymonucleateinwirkung. Überalterte Prophase mit Chromosomen von Metaphasegestalt und verschmierter Kernsubstanz. Links daneben überalterte Prophase vom üblichen Aussehen. Carminessigsäure. 800  $\times$ .

Abb. 15. *Vicia faba*, Thymonucleateinwirkung. Tripolare Anaphase. Die beiden kleineren Pole mit je einem „haploiden Satz“. Carminessigsäure. 800  $\times$ .

Es sei noch vermerkt, daß einmal bei einer tripolaren Anaphase an den beiden „kleineren Polen“ je ein haploider Chromosomensatz festgestellt wurde (Abb. 15).

## 2. Vergleich verschiedener Stoffe.

Im folgenden ist die Wirkung aller noch nicht beschriebenen Stoffe (s. Tabelle 1) zusammengefaßt. Ein solches Vorgehen ist um so mehr gerechtfertigt, als diese Substanzen auch alle in derselben Versuchsreihe und neben derselben Kontrolle geprüft wurden. Auf spezifischere Effekte einzelner Stoffe wird weiter unten kurz eingegangen.

Die Veränderungen der Teilungsintensität s. Abb. 16—19. Aus den Kurven ist zu ersehen, daß alle Versuche ebenso wie die Kontrolle auf das Umsetzen (diesmal unmittelbar aus Sägespänen) mit einem Schock reagieren, der sich in einem beträchtlichen Absinken der Mitosefrequenz äußert. Die Kontrollpflanzen erholen sich nach 8 Std; ihre Teilungsrate steigt schwach an. Das Absinken der Mitose-

häufigkeit in den ersten Stunden ist bei allen Substanzen erheblicher als bei der Kontrolle. Auch bei ihnen ist allerdings eine vorübergehende Erholung festzustellen, die fast durchweg zwischen 6 und 12 Std liegt. Dann folgt eine sehr starke Abnahme der Teilungsfrequenz. Nach 24stündiger Einwirkung befinden sich nur

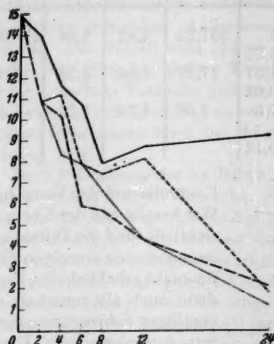


Abb. 16. Einwirkung verschiedener Stoffe auf *Vicia faba*. Ordinate: Teilungshäufigkeit in Prozenten. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ..... Adenosin m/200, ..... Uracil m/200, ——— Thymin m/200.

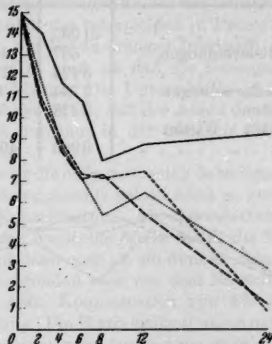


Abb. 17. Einwirkung verschiedener Stoffe auf *Vicia faba*. Ordinate: Teilungshäufigkeit in Prozenten. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ..... Ribose-nucleinsäure 0,1 %, ..... Histidin m/200, ——— Arginin m/200.

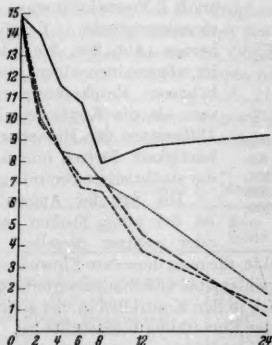


Abb. 18. Einwirkung verschiedener Stoffe auf *Vicia faba*. Ordinate: Teilungshäufigkeit in Prozenten. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ..... Harnstoff m/100, ..... Malonsäure m/200, ..... Harnstoff m/100 und Malonsäure m/200.

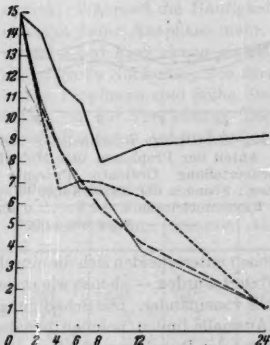


Abb. 19. Einwirkung verschiedener Stoffe auf *Vicia faba*. Ordinate: Teilungshäufigkeit in Prozenten. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, ..... Harnstoff m/100, ..... Milchsäure m/200, ..... Harnstoff m/100 und Milchsäure m/200.

noch 1–3% der Zellen in Teilung. (Es ist durchaus möglich, daß bei Weiterführung der Versuche über eine längere Zeitspanne bei optimalen Bedingungen die Bohnen sich an die eine oder andere Substanz gewöhnt hätten.) Die Abhängigkeit der Wirkung von der Zeit ist durchweg gut gesichert, ebenso die Unterschiede zwischen der

Tabelle 4. Endanalyse zum Versuch mit verschiedenen Stoffen. Teilungshäufigkeit.

Variationsursache	Quadrat der Abwei- chungen	Frei- heits- grade	Varianz	F berech- net	F Grenzwert		F berechnet F Grenzwert	
					0,05	0,01	0,05	0,01
Zeiten . . . . .	21930	5	4386	287,22	2,42	3,44	118,68	83,49
Zeiten $\times$ Wiederholungen . . .	687	45	15,27					
Stoffe . . . . .	3424	11	311,37	17,27	1,84	2,35	9,38	7,35
Stoffe $\times$ Wiederholungen . . .	1784	99	18,02					
Stoffe $\times$ Zeiten . . . . .	2228	55	40,5	2,01	1,35	1,53	1,49	1,31
Stoffe $\times$ Zeiten $\times$ Wieder- holungen . . . . .	9963	495	20,13					

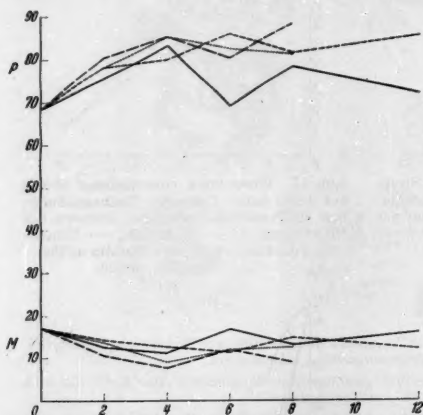


Abb. 20. Einwirkung verschiedener Stoffe auf *Vicia faba*. Anteil der Prophasen und Metaphasen an der Stadienverteilung. Ordinate: Prozente der Stadien. Abszisse: Stunden der Einwirkung. — Kontrolle, - - - - - Ribosenucleinsäure 0,1%, ..... Thymin m/200, — · — · — Adenosin m/200.

Kontrolle und den Versuchen.

Wie bereits aus der Kurve ersichtlich, sind die Differenzen zwischen den einzelnen Stoffen nicht erheblich. Sie liegen denn auch alle innerhalb der zufälligen Schwankungsbreite mit Ausnahme von Uracil, das zu den meisten anderen Substanzen gesicherte Unterschiede aufweist.

Die kurvenmäßige Darstellung der Stadienverteilung greift 3 Versuchslösungen als charakteristische Beispiele heraus (Abb. 20). Sie haben im allgemeinen einen etwas höheren Prophasenprozentsatz als die Kontrolle. Die Differenzen der Metaphasenhäufigkeit dürften innerhalb der statistischen Breite liegen.

Die Art der Anomalien ist bei allen Stoffen mehr oder weniger dieselbe. Im

Aussehen unterscheiden sich die einzelnen Objekte, die nach derselben Einwirkungszeit fixiert wurden — ebenso wie in der Teilungsintensität und Stadienverteilung — stärker voneinander. Die Schädigungen, die sich in den Kontrollen in viel geringerem Ausmaße finden, nehmen mit der Dauer der Einwirkung beträchtlich zu. Die Struktur der Ruhekerne ist öfters vergrößert, meist körnig, aber auch netzförmig, nach 24stündiger Einwirkung oft sogar pyknotisch. Die überalterten Prophasen vermehren sich sehr stark. Die Metaphasen neigen zu Verklebungen bis Verklumpungen. Ihre Chromosomen sind verkürzt. Nicht selten bleiben bei der Anaphasebewegung Chromosomen in der Metaphaseebene liegen. Es werden auch Anaphase- und Telophasebrücken beobachtet, Pseudoamitosen und Restitutionskerne aus der Metaphase, zuweilen auch schon aus der Prophase. Weiter finden sich zweikernige Zellen, sowie Mikronuclei und degenerierende Fragmente.

Von Adenosin ist besonders bemerkenswert, daß es die für Adenin so charakteristischen Phänomene der C-Mitose nicht zeigt. Adenosin, Uracil und Thymin weisen morphologisch in der oben beschriebenen Weise beträchtliche Unterschiede zu der

Kontrolle auf. Etwas normaler verhalten sich Histidin und Arginin, sowie Harnstoff, Malonsäure und Milchsäure. Die Kombination von Harnstoff und Malonsäure bzw. Milchsäure hat wieder stärkere Schädigung zur Folge. Auf die Wirkung des Ribonucleates wird weiter unten eingegangen.

Tabelle 5 faßt die Gesamtzahl der ausgewerteten Metaphasen von je 5 Einwirkungszeiten zusammen und stellt sie den entsprechenden Zahlen der tetraploiden Metaphasen gegenüber. Außerdem ist der Anteil der tetraploiden in Prozent angegeben. Die Zahlen sind jedoch zu klein, die Schwankungen innerhalb eines Stoffes von einer zur andern Einwirkungszeit zu groß, als daß die Homogenität für die einzelnen Versuche gesichert werden könnte. Die Unterschiede scheinen sowieso mehr zufallsbedingt zu sein. Bemerkenswert ist, daß der Anteil der tetraploiden Metaphasen auch bei Adenosin sich durchaus in der üblichen Größenordnung hält.

Die 0,1 % -Lösung des Na-Ribonucleates zeigt die oben genannten Schädigungen stärker als die übrigen Versuche. Seine Wirkung scheint jedoch nicht so groß zu sein wie die des Thymonucleates gleicher Konzentration. Als Besonderheit sei angeführt, daß sich die restlose Auflösung des Nucleolus öfters bis in die frühe Metaphase hinein verzögert; er ist im Präparat dann noch als ein dunkler Schatten wahrzunehmen. Aus später zu erwähnenden Gründen kam von dem Na-Salz der Ribosenucleinsäure auch die ungewöhnlich hohe Konzentration vor: 4% (40 g Substanz in 1 Liter Nährlösung!) zur Anwendung. Die Wurzelspitzen waren extrem schlecht gutschubar. Auf eine quantitativ-statistische Auswertung wurde verzichtet. Es war aber leicht festzustellen, daß die Teilungshäufigkeit in den Versuchsobjekten in den ersten Stunden größer war als in den Kontrollen. Der Anteil der Prophasen war auffallend hoch, ebenso die Zahl der Metaphasen. Außergewöhnlich gering war der Prozentsatz der Anaphasen. Dieses Bild ändert sich nach 12stündiger Einwirkung: Die Teilungsintensität liegt beträchtlich unter dem Normalen. Der Anteil der Prophasen geht zurück. Während die Häufigkeit der Metaphasen bleibt, findet sich praktisch überhaupt keine Anaphase mehr.

Morphologisch bieten die Objekte nach 4 und 8 Std Einwirkung ein charakteristisches Bild. Die Ruhekern haben auffallend große Nucleolen; ihre Struktur ist meist stark netzförmig (Abb. 21). Die meisten Prophasen sind frühe Stadien. Manche späte Prophasen zeigen bereits eine Tendenz zur Verklebung. Die verkürzten Metaphasechromosomen weisen unscharfe Konturen auf und neigen sehr

Tabelle 5. Anteil der tetraploiden Metaphasen.

Stoffe	Kontrolle	Ribonucleat	Uracil	Thymin	Adenosin	Histidin
Gesamtzahl der ausgewerteten Metaphasen . . .	3071	2000	1571	1407	947	949
Tetraploide Metaphasen .	8	7	12	8	7	4
Prozent . . . . .	0,26	0,35	0,76	0,57	0,74	0,42
Stoffe	Arginin	Harnstoff	Malonsäure	Milchsäure	Harnstoff und Malonsäure	Harnstoff und Milchsäure
Gesamtzahl der ausgewerteten Metaphasen . . .	956	890	944	933	1194	1057
Tetraploide Metaphasen .	0	3	10	1	7	4
Prozent . . . . .	0,00	0,34	1,06	0,10	0,59	0,38

zu Verklebungen und Verklumpungen. Zuweilen wird auch eine Zweiteilung der Chromosomenzahl versucht wie bei der Adenineinwirkung. Wo die Chromosomenzahl festzustellen ist, wird stets die normale Anzahl ermittelt. Die wenigen Anaphasen sind durchweg abnormal. Das Auseinanderweichen der beiden diploiden Chromosomensätze scheint mit großen Schwierigkeiten verbunden zu sein. Anaphase- und Telophasebrücken, 2 Restitutionskerne in einer Zelle, auch mit Brücken, Kleinkerne und degenerierende Fragmente sind keine Seltenheit. Restitutionskerne aus der Metaphase erinnern ebenfalls an das Adenin.

Eine bemerkenswerte Erscheinung sind oft beobachtete Kernteilungsfiguren, von denen nicht mit Sicherheit zu sagen ist, ob sie modifizierte Prophasen oder Anaphasen sind (Abb. 22): Chromosomen mit mehr oder weniger unscharfer Kontur

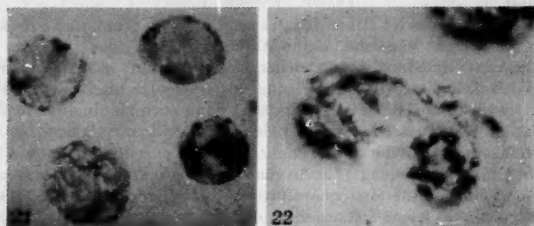


Abb. 21. *Vicia faba*, Ribonucleateinwirkung. Ruhekerne mit netzförmiger Strukturvergrößerung und abnorm großen Nucleolen. Carminessigsäure. 600  $\times$ . Vgl. Abb. 9.

Abb. 22. *Vicia faba*, Ribonucleateinwirkung. Prophase oder Anaphase, vgl. den Text! Carminessigsäure. 1400  $\times$ .

scheinen nach 2 Polen hin auseinanderzuweichen. Meist hängen sie noch über Brücken zusammen. Der Gesamteindruck weist mehr auf Prophasen hin.

Nach 12 Std sind die Phänomene im wesentlichen dieselben. Die Prophasen sind jedoch oft überaltert, die Ruhekerne, nach Regionen verschieden, größtenteils pyknotisch: die zuerst in gewissem Rahmen fördernde Wirkung der Substanz ist augenscheinlich umgeschlagen.

#### b) Kontrollversuche mit *Vicia* unter Anwendung der Nuclealreaktion.

Zur Überprüfung der mit Carminessigsäure gewonnenen Ergebnisse wurden die meisten Versuche wiederholt und diesmal der Nuclealreaktion nach Feulgen unterworfen. Fast alle Befunde werden klar bestätigt. Auch die polyploidisierende Wirkung des Adenins ließ sich schön reproduzieren. Es zeigte sich jedoch, daß zur Beurteilung der Ruhekernstruktur und der unterschiedlich starken Färbbarkeit eine Kontrolle mit der Feulgen-Reaktion unerläßlich ist. Nie wird durch sie das Objekt in dem Maße überfärbt, wie es die Carminessigsäure nach vielen Einwirkungen zur Folge hat. Der Eindruck intensiverer Färbung wird bei Feulgen nicht durch die größere Intensität des einzelnen angefärbten Partikels, sondern durch deren kompaktere Lagerung bewirkt. Dies ist bei vielen Ruhekernen und den oft erwähnten verkürzten Metaphasechromosomen der Fall. Auch Strukturvergrößerungen der Ruhekerne erscheinen nach der Nuclealreaktion nicht so kraß: die oben angeführte „körnige“ Vergrößerung ist kaum zu erkennen. Dagegen bestätigt sich die netzförmige Degeneration des Kerngerüstes. Normale Ruhekerne zeigen mit der Feulgen-Färbung eine fein gepunktete Struktur (Abb. 9). Die Chromozentren sind in günstigen Fällen klar zu erkennen (Abb. 23). Die Nucleolen färben sich



nicht an, ebensowenig die Spindel. Es scheint zuweilen, daß der Nucleolus an einer Stelle unmittelbar an das Cytoplasma grenze. Eine Beobachtung ist natürlich nur dann möglich, wenn diese „Pforte“ in einer Ebene senkrecht zur Blickrichtung liegt. Bei durch Einwirkung kompakteren Kernen wird die „Pforte“ stark vergrößert und so besser sichtbar (Abb. 24). Es sei noch vermerkt, daß nach Einwirkung von Thymonucleat in den Nucleolen die oben angeführten dunklen Partikel nicht gefunden wurden, wohl aber mitunter hellere Stellen. Die Chromosomen lassen ihren Aufbau aus 2 Chromatiden viel besser erkennen, als dies mit dem Ernstschen Gemisch der Fall ist. Oft sieht man in den Metaphasen an einem sonst einheitlichen Chromosom die beiden Chromatiden der achromatischen Stellen. Allgemein sind die Chromosomen länger. In den Präparaten, die der Nuclealreaktion unterworfen wurden, ist durchweg eine scheinbare Intensivierung der Brownischen Molekularbewegung festzustellen.

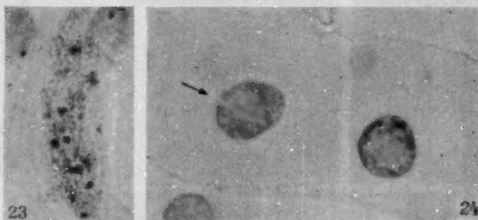


Abb. 23. *Vicia faba*, normaler Ruhekern aus älterem Gewebe mit deutlich sichtbaren Chromozentren. Feulgen. 900  $\times$ .

Abb. 24. *Vicia faba*, Thymonucleateinwirkung. Kompakte Vergrößerung der Ruhekernstruktur. Linker Kern mit einer „Nucleolus-Pforte“. Feulgen. 1200  $\times$ . Vgl. Abb. 9.

### c) Versuche mit *Impatiens*.

*Impatiens balsamina* ist ein typisch heterochromatisches Objekt mit  $2n = 14$  Chromosomen. Diese besitzen zu beiden Seiten der Insertionsstelle ein heterochromatisches Mittelstück, das sich jeweils in einem längeren euchromatischen Abschnitt fortsetzt. Im Ruhekern sind die heterochromatischen Teile als  $\pm 14$  Chromozentren deutlich zu erkennen (Abb. 25). Die Prophase (Abb. 26) zeigt alle Übergänge von diesen Chromozentren bis zu den Metaphasechromosomen (Abb. 27), bei denen ihrer starken Aufspiralisierung und damit Verkürzung wegen keine eu- und heterochromatischen Abschnitte mehr zu unterscheiden sind. In der späten Telophase geht diese Entwicklung, allerdings weniger gut sichtbar, rückläufig. Die Prophasechromosomen lassen im Eu- und Heterochromatin sogenannte Chromomeren unterscheiden. Eine Dekondensation des Heterochromatins wurde einige Male beobachtet. Interessant ist auch die Tatsache, daß die beiden Chromatiden der Prophasechromosomen in ihren heterochromatischen Teilen bedeutend dichter nebeneinander liegen als in den euchromatischen Abschnitten (Abb. 26). — Die Schwankungsbreite bezüglich der Zellgröße, Färbbarkeit und Chromozentrengröße ist in ein und demselben Präparat auch der Kontrolle recht erheblich.

Die Ergebnisse der *Vicia*-Versuche werden morphologisch an den *Impatiens*-Präparaten im allgemeinen bestätigt. Allerdings scheint *Impatiens* auf chemische Beeinflussung nicht so stark zu reagieren wie *Vicia* in Nährlösungskultur. Folgende Befunde seien im einzelnen angeführt: Die charakteristische Wirkung des Adenins zeigt sich auch bei *Impatiens*. Ebenfalls nach 6 Std ist die weit überwiegende Mehrzahl der Teilungsstadien Metaphasen. Diese haben fast alle den tetraploiden

**Chromosomensatz.** Die Schwesterchromosomen liegen meist dicht nebeneinander (Abb. 28). Es kommen indessen auch größere Abstände zwischen ihnen vor, sowie eine völlig selbständige Lage. Auch mißglückte Versuche einer Verteilung der Chromosomen werden beobachtet. Die Metaphasechromosomen sind verkürzt (vgl. Abb. 28 mit Abb. 27). Nach 12 und 24 Std ist — neben einem starken Rückgang der Teilungshäufigkeit — oft eine Verdoppelung der Chromozentren zu beobachten, die auf eine Tetraploidie zurückzuführen ist (Abb. 29, vgl. Abb. 25). Die Nucleolen erscheinen allgemein stärker angefärbt. — Die letzte Feststellung sei auch bei dem Thymonucleatversuch herausgehoben. Es scheint zudem, daß die

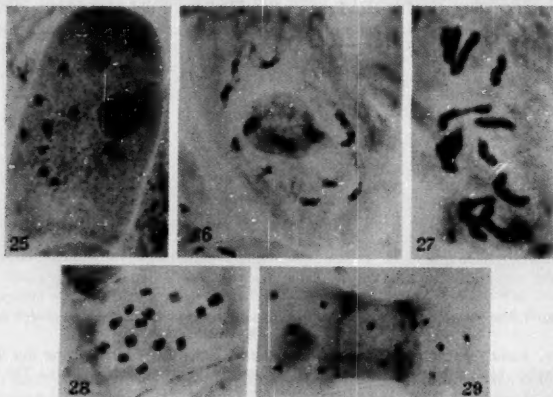


Abb. 25. *Impatiens balsamina*. Normaler Ruhekern. Carminessigsäure. 1050  $\times$ .

Abb. 26. *Impatiens balsamina*. Normale Prophase. Carminessigsäure. 1050  $\times$ .

Abb. 27. *Impatiens balsamina*. Normale Metaphase. Carminessigsäure. 1800  $\times$ .

Abb. 28. *Impatiens balsamina*. Adenineinwirkung. C-mitotische Metaphase mit gepaarten und stark verkürzten Schwesterchromosomen. Carminessigsäure. 900  $\times$ .

Abb. 29. *Impatiens balsamina*. Adenineinwirkung. Tetraploider Ruhekern nach C-Mitose mit doppelten Chromozentren. Carminessigsäure. 600  $\times$ .

Chromozentren im Durchschnitt größer sind als die der Kontrolle. Die Metaphasechromosomen sind verkürzt. Dasselbe Bild bieten die Wurzelspitzen nach der Einwirkung des Hefenucleates. — Die mit Histidin behandelten Zellen weisen in Übereinstimmung mit HÖVERMANN (1951) zum Teil größere und unregelmäßige Chromozentren auf.

## II. Chromosomale Mutationen.

Zur quantitativen Erfassung der Chromosomenmutationen wurden jeweils die Metaphasen herangezogen, da diese einer genaueren Analyse am zugänglichsten sind.

Restitutionen wurden keine eindeutigen gefunden, obwohl oft starke Ruhekernschädigungen festzustellen waren. Relativ häufig wurden achromatische Stellen beobachtet. Da es aber hier alle Übergänge von der Grenze der Sichtbarkeit bis zur völligen Auflockerung der Chromo-

somenstruktur gibt, erscheinen diese sogenannten „unvollständigen Fragmentationen“ für einen quantitativen Vergleich nicht geeignet.

Als Fragmentation wurde eine Chromosomenanomalie dann gewertet, wenn die beiden Teile entweder sehr weit voneinander entfernt lagen oder durch ihre Lage zu erkennen gaben, daß die Längsverbindung zwischen ihnen unterbrochen war. Es ist natürlich sehr wichtig, daß gerade bei einer solchen Ermessensfrage in Kontrolle und Versuch streng derselbe Maßstab angelegt wird. Zur Feststellung eines eventuell mutagenen Einflusses der angewendeten Chemikalien wurde jeweils das Ver-

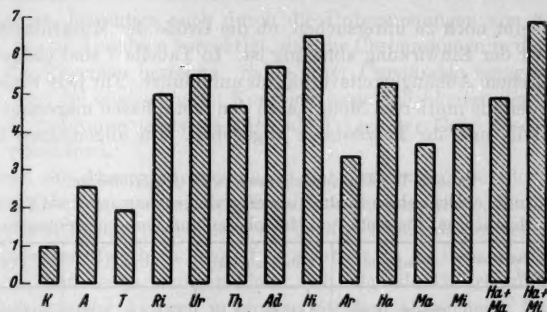


Abb. 30. Prozentsätze der mutierten Metaphasen der Versuche, bezogen auf die Prozentsätze der mutierten Metaphasen der Kontrolle = 1. K Kontrolle, A Adenin, T Thymonucleinsäure, Ri Ribosenucleinsäure, Ur Uracil, Th Thymin, Ad Adenosin, Hi Histidin, Ar Arginin, Ha Harnstoff, Ma Malonsäure, Mi Milchsäure.

hältnis „mutierte Metaphasen : auswertbare Metaphasen“ in Versuch und zugehöriger Kontrolle verglichen (s. Abb. 30!). Als mutierte Metaphasen wurden diejenigen gewertet, die Fragmente enthalten. Meist ist es eines, selten mehrere bis viele. Die vorkommenden tetraploiden Metaphasen, also Genom-Mutanten, sind hier nicht mit gerechnet. Als auswertbar wird eine Metaphase dann bezeichnet, wenn sämtliche Chromosomen zu erkennen sind. Der Anteil der auswertbaren Metaphasen variiert in den einzelnen Versuchen in mäßigen Grenzen. *Der Prozentsatz der mutierten Metaphasen ist in allen Versuchen wesentlich höher als in der Kontrolle. Die Differenzen sind statistisch gut gesichert.*

Um zu ermitteln, ob bezüglich der Fragmentationsbereitschaft Unterschiede zwischen den Chromosomen oder gar ihren Teilen bestehen, wurden alle Versuche zusammengefaßt (Tabelle 6). Eine Auswertung der Differenzen zwischen den einzelnen Versuchen ist der viel zu kleinen Zahlen wegen nicht berechtigt. Insgesamt stehen 149 Fragmentationen der 10 kleinen 410 Brüche der beiden großen Chromosomen gegenüber. Bei der Verteilung auf die Länge der SAT-Chromosomen sind Insertionsstelle und sekundäre Einschnürung ungleich bevorzugt.

Tabelle 6. Verteilung der Brüche über das Genom sowie über die Länge der großen Chromosomen. (Die Zahlen in den 6 letzten Spalten bedeuten Brüche.)

	Ausgewertete Meta- phasen	Kleine Chromo- somen	Große Chromo- somen	Sekun- däre Ein- schnü- rung	Schen- kel	Inserti- ons- stelle	Schen- kel
	der großen Chromosomen						
Kontrolle . . . .	2444	21	44	21	0	22	1
Versuche . . . .	4946	128	366	136	9	213	8
Insgesamt . . . .	7390	149	410	157	9	235	9

Es bleibt noch zu untersuchen, ob die Größe der Mutationsrate von der Dauer der Einwirkung abhängig ist. In Tabelle 7 sind einige Stoffe mit typischem Abhängigkeitsverhältnis aufgeführt. Für jede Fixierungszeit werden die mutierten Metaphasen den Metaphasen insgesamt gegenübergestellt und ihr Prozentsatz angegeben. Im allgemeinen ist eine

Tabelle 7. Einwirkungsdauer und Mutationsrate.

(Die Zahlen in den einzelnen Spalten beziehen sich nacheinander auf die Gesamtzahl der Metaphasen, die mutierten Metaphasen und deren prozentualen Anteil.)

Einwirkungsdauer in Std	Kontrolle	Ribosenucleat	Uracil	Thymin
2	572:7 1,22	241:18 7,47	144:14 9,72	196:12 6,12
4	245:3 1,22	119:7 5,88	175:14 8,00	72:4 5,56
6	444:6 1,35	85:6 7,06	143:9 6,29	114:7 6,14
8	143:3 2,10	87:6 6,90	93:3 3,22	82:6 7,32
12	284:5 1,76	65:5 7,69	78:9 11,54	34:4 11,76
24	169:3 1,78	42:10 23,80		

Einwirkungsdauer in Std	Adenosin	Histidin	Harnstoff und Milchsäure
2	40:2 5,00	59:10 16,95	108:10 9,26
4	24:1 4,17	40:0 0,00	75:5 6,67
6	63:6 9,52	38:5 13,15	54:4 7,41
8	46:3 6,52	45:2 4,44	27:4 14,81
12	29:4 13,79	49:4 8,16	25:5 20,00

Steigerung der Mutabilität nur konstatierbar bei den jeweils letzten Fixierungen, die überhaupt noch eine nennenswerte Zahl von Metaphasen aufweisen. Ganz unregelmäßige Verhältnisse zeigt das Histidin. Die Zahlen sind aber wohl so klein, daß statistische Schwankungen das Bild zu sehr beeinträchtigen.

#### D. Diskussion.

Um den Ort der vorliegenden Untersuchungen näher zu kennzeichnen und die zugrunde liegende Fragestellung deutlich zu machen, sei kurz auf einige Ergebnisse und Probleme des Nucleinsäurestoffwechsels eingegangen.

### I. Zur Fragestellung.

Zusammensetzung und Struktur der Nucleinsäuren sind weitgehend aufgeklärt (GULLAND 1951). Sie bestehen aus Pentose, Purin- und Pyrimidinbasen sowie aus Phosphorsäure in etwa äquimolaren Mengen. Hefenucleinsäure enthält als Pentose die Ribose: Ribo(se)nucleinsäure; Thymonucleinsäure die Desoxyribose: Desoxyribosenucleinsäure. Die Ribosenucleinsäuren scheinen relativ verzweigt zu sein mit Molekulargewichten von 10000—300000. Die Desoxyribosenucleinsäuren dagegen sind anscheinend langgestreckte Ketten vom Molekulargewicht 500000 bis 2000000.

Man ist, besonders auch durch die Untersuchungen von STEDMAN (1951), zu der Annahme berechtigt, daß die Chromosomen in der Hauptsache aus Eiweißen bestehen. Seine unter Umständen langgestreckten Ketten und die unabsehbaren Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Aminosäuren lassen es auch als Träger der Gene besonders geeignet erscheinen.

Durch die Absorptionsmessungen der CASPERSSON-Schule (vgl. die zitierten Arbeiten) und mit den Methoden von RIS (1947), SERRA (1947) und anderen bekam man eine recht genaue Kenntnis des sogenannten Nucleinsäurestoffwechsels, soweit er sichtbar zu machen war. Zur Erklärung dieser Beobachtungen bietet sich folgende Theorie an (von der allerdings manche Autoren in einigen Stücken abweichen): Das Chromonema besteht aus höherem Eiweiß. Zu Beginn der Prophase findet eine Umwandlung der Ribonucleotide und wohl auch eines Teiles der basischen Eiweiße des Nucleolus in Thymonucleinsäure statt, die sich dann an die getragenden Chromatiden anlagert: die Matrix. Dabei werden sich die basischen Gruppen der Nucleinsäure an die sauren des Chromosomeneiweißes anlagern und umgekehrt. So bildet die Desoxyribosenucleinsäure sozusagen ein negatives Abbild der Wirkgruppen des Chromosoms. An diese Matrize können sich nun Aminosäuren in entsprechender Weise anlagern und zu einer Eiweißkette verbinden, die nun wieder die Wirkgruppen in positiver Anordnung trägt. Dies wäre eine Modellvorstellung für die identische Reduplikation der Gene und Chromosomen (vgl. Schema Abb. 31). Der Aufspiralisierungsprozeß scheint ebenfalls mit der Nucleinsäurebeladung zusammenzuhängen; in welcher Weise ist unklar. In der Telophase findet eine Rückverwandlung der Thymonucleinsäure in Histone und Ribonucleotide statt, die sich dann an der sekundären Einschnürung der SAT-Chromosomen, genauer gesagt, an dem dort liegenden heterochromatischen „nucleolar-organizer“ ansammeln und den Nucleolus bilden (HERTZ 1932). Die Aufgabe der Desoxyribosenucleinsäure scheint deshalb vor allem die identische Reproduktion des Chromosomeneiweißes zu sein. Ihre langgestreckten, sehr hochmolekularen Ketten erscheinen hierzu besonders geeignet. —

Einige Stellen des Chromosoms geben ihre Nucleinsäure in der Telophase nicht ab. Sie behalten deshalb ihre Färbbarkeit und Sichtbarkeit auch im Ruhekern bei: das Heterochromatin, das im Ruhekern die Chromozentren bildet (Abb. 23 und 25). Wie von McCINTOCK (1950) an Mais festgestellt werden konnte, findet sich das Heterochromatin auch an allen Stellen des Chromosoms, deren Gene in den betreffenden Differenzierungsstadien blockiert sind. Wenn die Gene in einer bestimmten Konfiguration von Seitenketten des Chromosomen-eiweißes bestehen, so kann man sich ihre Inaktivierung sehr gut durch ihre Bindung an die entsprechenden Gruppen der Nucleinsäure erklären.

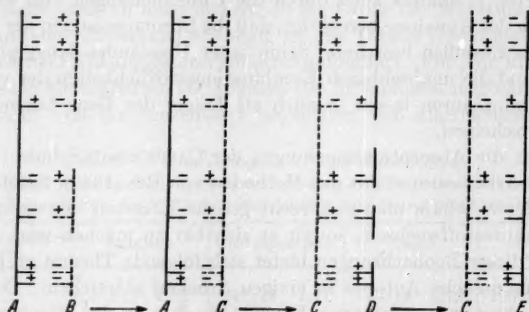


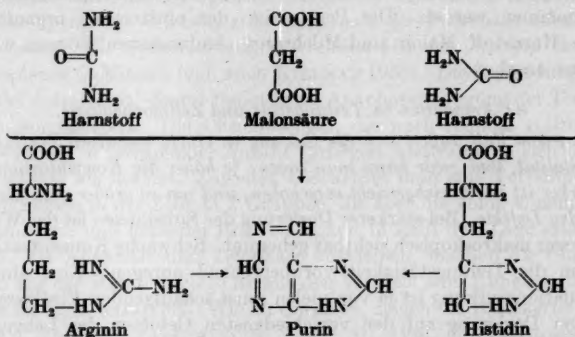
Abb. 31. Modell für die identische Reproduktion von Eiweißketten mittels Nucleinsäuren. Nach FRIEDRICH-FREKSA (1940). A Chromosomen-eiweiß, B Nucleotide, C Desoxyribonucleinsäure, D Aminosäuren, E identisch reproduziertes Chromosomen-eiweiß.

CASPERSSON und THORELL bezeichnen das Heterochromatin als das dem Nucleolus zugeordnete („nucleolus-associated“) Chromatin, weil es Eiweiße bildet, die reich an Hexonbasen sind und den Hauptbestandteil des Nucleolus ausmachen. Es scheint Steuerungszentrum für die Synthese der Cytoplasmaproteine zu sein. Vom Nucleolus aus wandern Proteine zur Kernmembran. Sie treten dort stofflich in irgendeine Beziehung, vielleicht als Baumaterial, zu der Ribosenucleinsäure, die um den Kern im Cytoplasma lokalisiert ist. Sie synthetisiert aus den Aminosäuren die Cytoplasmaproteine. Ihre im Gegensatz zu der Thymonucleinsäure verzweigte Struktur wäre hierzu besonders geeignet.

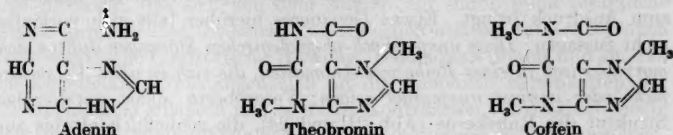
Bei der Bedeutung der Eiweiße für das Leben überhaupt ist die ungestörte Funktion der für ihren Aufbau maßgebenden Nucleinsäuren von großer Wichtigkeit, zumal es sehr wahrscheinlich ist, daß auch die identische Reproduktion der Gene über sie verläuft. Die Herkunft der einzelnen Bausteine der Nucleinsäuren ist noch nicht restlos aufgeklärt. Die Phosphorsäure wird als solche von der Pflanze aufgenommen. Die Pentosen dürften unmittelbar aus dem Assimilationsprozeß hervorgehen.



Die Herkunft der Pyrimidin- und Purinbasen ist umstritten (STEUDEL 1903, KALCKAR 1951, vgl. auch die bei CASPERSSON und THORELL 1951 diesbezüglich aufgeführte Literatur; s. CASPERSSON 1950). Es ist anzunehmen, daß sie entweder aus Harnstoff und stickstofffreien 3-C-Körpern synthetisiert werden oder von den Aminosäuren Arginin und Histidin abstammen. Für die erste Annahme sprechen die Ergebnisse von Fütterungsversuchen, für die zweite das reiche Vorkommen der beiden Hexonbasen überall dort, wo sich Nucleinsäuren in größeren Konzentrationen finden.



Für die identische Reproduktion von Eiweißen ist es nach den angeführten Hypothesen notwendig, daß auch die Nucleinsäuren die genau entsprechende Struktur haben. Eine Veränderung dieser Struktur müßte sich in Veränderungen der von den Nucleinsäuren mit aufgebauten Strukturen äußern. Eine solche Störung kann auf 2 Weisen eintreten: Einmal, wenn statt der physiologischen Bausteine unphysiologische Derivate in den Prozeß eingeschaltet werden, z. B. statt des Adenins die Alkaloide Theobromin und Coffein,



oder wenn das natürliche Gleichgewicht im Angebot der Nucleinsäurebausteine einseitig stark verschoben wird, so daß etwa von einer Purinbase mehr als normal eingebaut wird. Beide Störungen lassen sich experimentell dadurch hervorrufen, daß man etwa höhere Pflanzen in Nährlösungen kultiviert und diesen die betreffenden Substanzen zugibt. Alkaloidversuche wurden von KIHLMAN und LEVAN (KIHLMAN 1940,

KIHLMAN und LEVAN 1951) durchgeführt. Die zweite Fragestellung liegt der vorliegenden Untersuchung zugrunde: Was geschieht, wenn das Gleichgewicht der natürlichen Nucleinsäuren oder ihrer Baustoffe gestört wird?

## II. Diskussion der Versuchsergebnisse.

Solche Versuche sind nur sinnvoll, wenn die betreffenden Substanzen in die Zelle eindringen. Für Purinbasen ist dies von TRÖNDLE (1920) nachgewiesen. Von den makromolekularen Substanzen wissen wir durch das Beispiel der Fermente, daß sie — wohl unter Energieaufwand — aufgenommen werden. Die Permeation der einfacheren organischen Stoffe (Harnstoff, Malon- und Milchsäure, Aminosäuren) können wir als gegeben ansehen.

### a) Anomalien in Teilungsrate und Zellmorphologie.

*In jedem Fall äußert sich die Störung in einem negativen Einfluß auf die Vitalität, und zwar kann man sagen: je höher die Konzentration, um so stärker ist das Gleichgewicht verschoben, und um so größer sind die auftretenden Defekte.* Bei stärkerer Dosierung der Substanzen ist das Wachstum sogar makroskopisch sichtbar gehemmt. Schwache Konzentrationen können die Teilungstätigkeit vorübergehend anregen. Eine ähnliche Stimulationswirkung ist ja von vielen sonst schädigenden Einflüssen bei geringer Dosierung auf den verschiedensten Gebieten des Lebendigen bekannt. Die stärkeren Konzentrationen aller in den Versuch einbezogenen Stoffe wirken jedoch hemmend. Augenscheinlich ist die Pflanze vorübergehend in der Lage, dem gestörten Gleichgewichte Rechnung zu tragen und sich ihm anzupassen: Es ist jeweils eine vorübergehende Erholung festzustellen, die sich in einem kurzfristigen Wiederaufleben der Teilungstätigkeit äußert. Dann treten aber kaum mehr Zellen in die Mitose ein.

Der Grund dieser starken Schädigung ist wohl das, was MARQUARDT (1938, 1940) in der Bezeichnung „unspezifisch-physiologische Störung“ zum Ausdruck bringt. Etwas Genaueres hierüber läßt sich vorläufig nicht aussagen. *Diese unspezifisch-physiologischen Störungen äußern sich morphologisch in einer Reihe von Anomalien, die sich in allen Versuchen mehr oder weniger ausgeprägt zeigen:* Vergrößerte, meist netzförmige Struktur der Ruhekerne (Abb. 21 und 24), die schließlich oft bis zur Pyknose führt. Die Eröffnung des Kernes ist verzögert. Da sich die Chromosomen verkürzen und ihre Metaphasestruktur annehmen, kommt das typische Bild der überalterten Prophase zustande (Abb. 3 und 14). Der Prozentsatz der Prophasen im Präparat kann auf diese Weise bedeutend ansteigen, ohne daß weitere Kerne in die Mitose eintreten. Dies äußert sich in einer Verschiebung der Stadienverteilung (z. B. Abb. 2). Störungen der Spindel manifestieren sich in tripolaren Spindeln

(Abb. 15), liegengebliebenen Chromosomen sowie Restitutionskernen aus der Metaphase und auch aus der Prophase heraus (z. B. Abb. 7). Ein unmittelbarer Eingriff in den Nucleinsäurestoffwechsel scheint die Ursache der Verkürzung sowie der Verklebungen und Verklumpungen der Chromosomen in der Metaphase zu sein, die dann Anaphase- und Telophasebrücken und Pseudoamitosen zur Folge haben. Es wurde schon angenommen (DARLINGTON 1951), daß die Polymerisation der Nucleinsäure gestört sei und es so zu Verklebungen der Matrix komme. Jedenfalls ist die Nucleinsäure beteiligt. Ob der Angriff der Substanzen an ihr direkt oder über das Cytoplasma erfolgt, ist vollständig ungewiß.

*Eine spezifische Wirkung zeigt die Zugabe der Purinbase Adenin zur Nährlösung. Die Spindelstörungen erreichen hier das Ausmaß von ausgesprochenen C-Mitosen* (vgl. auch KIHLMAN 1950). Die Ausbildung einer Spindel unterbleibt. Somit findet keine Anaphasebewegung der Tochterchromosomen statt. Die Chromosomen, die nach regulär vollzogener Längsteilung in tetraploider Anzahl vorliegen, kontrahieren sich bedeutend stärker als normal. Zuweilen beobachtet man eine Verteilung der Chromosomen in der Zelle in 2 Gruppen, die aber nie völlig voneinander getrennt sind und keinerlei Regelmäßigkeit in Zahl und Lage erkennen lassen. Da Anaphase und Telophase ausbleiben, machen die Chromosomen aus der Metaphaselage heraus den Wechsel zum Ruhekern durch. Dieser ist dann tetraploid. Wie zu erwarten, zeigen die Ruhekerne dann öfters 4 Nucleolen (Abb. 4, 5, 6, 7 und 8). (Vgl. zur C-Mitose auch ÖSTERGREN 1944, LOVELESS und REVELL 1949, LEVAN und LOTFY 1949 und 1950, KOLLER 1951.) ÖSTERGREN stellt eine Reihe von organischen Substanzen zusammen, die Spindelstörungen verursachen oder eigentliche C-Mitosen auslösen. Das Gemeinsame dieser Stoffe sieht er in ihren Löslichkeitsverhältnissen. Zu stark oder zu wenig wasserlösliche Stoffe sind C-mitotisch unwirksam. Adenin nimmt nun auch eine solche Mittelstellung zwischen Wasser- und Lipoidlöslichkeit ein. Von allen getesteten Substanzen ließ es sich am geringsten in der Nährflüssigkeit auflösen. Das Adenosin, das sich von dem Adenin nur durch seine zusätzliche Ribose unterscheidet, ist stärker wasserlöslich und hat tatsächlich auch keine spezifische C-mitotische Wirkung. ÖSTERGREN nimmt nun an, daß die betreffenden Substanzen sich an die lipophilen Seitenketten der Eiweißmoleküle anlagern und so deren Kontraktion verursachen. Seine sichtbare Auswirkung fände das in einer Verkürzung der Chromosomen. Auch die einzelnen Elemente der Spindel sollten ebenso kontrahieren. Da der fibrilläre Bau der Spindelmicellen Voraussetzung zu deren Funktion ist, kann kein Anaphasezug ausgeübt werden. (Vgl. das Schema nach ÖSTERGREN, Abb. 32.) Von den in der vorliegenden Arbeit getesteten Substanzen haben alle eine Verkürzung der Chromosomen zur Folge, einige in beträchtlich stärkerem Ausmaße, als dies nach Adenin-

behandlung der Fall ist. Dennoch ist dort die Häufigkeit der mitunter vorkommenden C-Mitosen nicht gesichert verschieden von deren normalem Auftreten.

Die Ribosenucleinsäure nimmt unter den besprochenen Versuchen insofern eine Sonderstellung ein, als sie in Form ihres Na-Salzes nicht nur in der 0,1%-, sondern auch einer 4%-Lösung zur Anwendung kam. Die 0,1%-Lösung ist größenordnungsmäßig mit denen der übrigen Stoffe zu vergleichen. Bei ihr fällt auf, daß die restlose Auflösung des Nucleolus sich oft bis in die frühe Metaphase hinein verzögert. Da er zum großen Teil aus Ribonucleotiden besteht und normalerweise auch einige der Aminosäuren seiner Histone zum Aufbau der Thymonucleinsäure heran-



Abb. 32. Modell für die Wirkung von C-Mitose-auslösenden Substanzen auf die Eiweißmicelle der Spindel. Nach ÖSTERGREN (1940). Spindelmicelle links normal, rechts C-mitotisch verkürzt.

gezogen werden, ist bei dem großen Ribonucleinsäuregehalt der Nährlösung das Angebot an Baustoffen wohl größer als der Bedarf, so daß sich der natürliche Abbau der Nucleolarsubstanzen verzögert. In der 4%-Lösung, die parallel zu den Konzentrationen der HUSKINS-Schule verwendet wurde, ist ein entsprechendes Phänomen zu beobachten: die Nucleolen der Ruhekerne sind auffallend groß (Abb. 21). Die Tendenz der Chromosomen zur Verklebung und Verklumpung ist ebenfalls außergewöhnlich hoch, so daß bei der Anaphasentrennung außerordentliche Schwierigkeiten auftreten, die sich in der Bildung sehr vieler Brücken manifestieren. Es wird allgemein angenommen, daß die Verklebungen eine Folge von Änderungen der Matrix darstellen. Diese sind wahrscheinlich wieder auf eine Störung der Nucleinsäuren zurückzuführen, vielleicht auf eine Herabsetzung ihres Polymerisationsgrades. Hier könnten die niedriger polymeren und verzweigten Moleküle der sonst sehr verwandten Ribosenucleinsäure eine Rolle spielen. Sonst liegt allerdings kein Hinweis dafür vor, daß sie an Stelle der Moleküle der Desoxyribosenucleinsäure in die Matrix eingebaut würden. — Nicht selten finden sich in den Präparaten Metaphasen, die eine Verteilung der Chromosomen auf 2 Gruppen zeigen, so wie es von der Adenineinwirkung her bekannt ist. Anaphasen und Telophasen finden sich ebenfalls so gut wie keine mehr. Besonders auffällig sind Konfigurationen, von

denen man nicht genau sagen kann, ob sie aus einer Anaphase oder — was eher anzunehmen ist — einer Prophase hervorgegangen sind (Abb. 22). HUSKINS hat bei Anwendung derselben Versuchslösung sowie durch Kälteeinwirkung auf die Wurzelspitzenmitose vieler Blütenpflanzen dieselben cytologischen Bilder erhalten. Die Metaphasen und die beschriebenen Prophasen bestanden aus dem diploiden Satz. Eine Verteilung von je einem haploiden Satz (zum mindesten der Zahl nach) kam öfters vor, als es bei zufälliger Zuordnung zu erwarten gewesen wäre. HUSKINS spricht hier von „somatischer Reduktionsteilung“ und „somatischer Meiosis“. Da die beschriebenen Konfigurationen auch in unbehandelten Kontrollen gefunden wurden, nur ungleich seltener, nimmt HUSKINS an, durch die Wirkung des Na-Ribonucleates sei ein Prozeß intensiviert worden, der auch gelegentlich einmal unter normalen Bedingungen ablaufen könne (HUSKINS 1948, 1949, HUSKINS und CHENG 1950, KODANI 1948, WILSON und CHENG 1949). PATAU und PATIL (1951) stellen in einer sehr sorgfältigen Untersuchung an *Rhoeo discolor* dieselben Phänomene fest, wie sie hier für *Vicia* beschrieben wurden. Sie sprechen nur von „reductional groupings“ und äußern die Ansicht: „Die meisten Reduktionsgruppierungen scheinen ohne bleibende Konsequenzen vorüberzugehen.“ LEVAN und LOTFY (1949) nehmen zu der „somatischen Reduktionsteilung“ Stellung. Sie interpretieren die Metaphase als „distributive Metaphase“ der C-Mitose: Es wurde wiederholt festgestellt, daß in der Metaphase die Chromosomen nach allen Richtungen „auseinandergestoßen“ erscheinen. Lag nun der vorausgegangene Prophasekern in der Mitte einer länglichen Zelle, so resultieren 2 Gruppen mit ungefähr gleicher Chromosomenzahl. Die von HUSKINS als „segregation and reduction“ während der Prophase bezeichneten Konfigurationen betrachten sie als Prophasen, die aus Restitutionskernen solcher distributiven C-Mitosen hervorgegangen sind. In einer Erwiderung hierauf betont HUSKINS mit Recht, daß die Colchicineinwirkung keine Reduktion der Chromosomenzahl zur Folge habe. Wie bemerkt, konnten ja diese „reductional groupings“ zuweilen ausgezählt und nur der diploide Satz festgestellt werden. Es ist hinzuzufügen, daß auch die besprochenen Prophasen tetraploid sein müßten, wenn die Deutung von LEVAN und LOTFY zuträfe. Nach den von HUSKINS veröffentlichten Aufnahmen ist dies jedoch nicht der Fall. Außerdem wurde von WILSON und CHENG an *Trillium* festgestellt, daß sich die homologen Chromosomen häufiger auf die beiden Gruppen verteilen, als dies den Zufallsgesetzen entspricht. Eine solche Regelmäßigkeit wäre durch die Theorie der „distributiven Mitose“ nach LEVAN und LOTFY nicht zu erklären.

In den vorliegenden Versuchen sehen die besprochenen Metaphasen genau so aus wie die zuweilen nach Adeninbehandlung gefundenen. Man ist versucht, ihre Bildung sowie das fast vollständige Ausbleiben von

Anaphasen und Telophasen auch hier der Wirkung von Adenin zuzuschreiben, das aus der Ribosenucleinsäure in Freiheit gesetzt sein könnte. Wenn seine Konzentration zu gering ist, was anzunehmen wäre, so kommt es eben — in Einklang mit den vorliegenden Adenin-Versuchen — nicht zur Bildung eigentlicher C-Mitosen. Eine Erklärung der Teilungsprophasen steht noch aus, wenn man annimmt, daß sie aus diploiden Kernen bestehen. Tatsächlich weist nichts auf eine Tetraploidie hin. Haploide Metaphasen und Anaphasen wurden nicht beobachtet. — Die Auslösung von Meiosis ist theoretisch nicht auszuschließen. STRAUB (1951) hat denn auch mit Adrenalin und Cystein zumindest ein beschleunigtes Eintreten der Meiosis bei *Actinophrys sol* bewirkt.

Die Thyminucleinsäure kam nur in der 0,1% -Lösung ihres Na-Salzes zur Anwendung. Ihre Wirkungen sind die bereits oben allgemein beschriebenen. Darüber hinaus ist es auffällig, daß auch hier die Ruhekerne überdurchschnittlich große Nucleolen haben. In ihnen finden sich häufig dunkle Partikel verschiedener Gestalt (Abb. 13). Sie bestehen nicht aus Thyminucleinsäure, da sie mit der Feulgen-Reaktion nicht nachzuweisen sind. Es könnte hier ein Umbau von Desoxynucleotiden der Thyminucleinsäure in Ribonucleotide stattgefunden haben. Hierzu wäre lediglich eine Oxydation erforderlich, allerdings ausschließlich der Pentose. Da dieser Prozeß normalerweise bei jeder Mitose in beiden Richtungen ablaufen muß (reduktiv beim Umbau der Ribonucleotide in Desoxyribonucleotide zu Beginn der Teilung, oxydativ bei der entsprechenden Rückverwandlung der Nucleotide in der späten Telophase), ist auch ein entsprechendes spezifisches Fermentsystem im Kern vorhanden. Einer Annahme des Umbaus von Nucleotiden und ihres Einbaues in den Nucleolus steht also nichts im Wege. So könnte der Nucleolus sein Volumen vergrößern und unter Umständen auch akzessorische Strukturen aufweisen. Die häufig beobachteten stark überalterten Prophasen mit besonders dicken Chromosomen und dunkler „verschmierter“ Grundsubstanz (Abb. 14) sind durch eine vermehrte Anlagerung und Ansammlung von Desoxyribosenucleinsäure zu erklären, die in der Versuchslösung weit über das Gleichgewicht hinaus angeboten wird. Die Nucleinsäure kann indessen auch über eine Hemmung des Fermentsystems wirken. So hat OHLMEYER (1949) gezeigt, daß sie sich mit der Prostataphosphatase verbindet und deren Aktivität bis auf 13% der ursprünglichen Wirksamkeit herabsetzt.

Es sei noch kurz auf die einmal gefundene Fehlverteilung eingegangen, bei der durch eine tripolare Spindel 2 Tochterpole jeweils genau einen haploiden Satz erhielten (Abb. 15). Ob allerdings auch die homologen Chromosomen genau entsprechend verteilt sind, läßt sich nicht feststellen. Dies ist unter den öfters vorkommenden tripolaren Teilungsfiguren der einzige Fall, bei dem eine solche „Reduktion“ beobachtet wurde.



Die im Versuch gebotenen Vorstufen hatten durchweg Störungen zur Folge. Ob allerdings durch Abbau der Aminosäuren Arginin und Histidin Purinbasen aufgebaut worden sind, läßt sich aus den Versuchsergebnissen nicht entnehmen. Die Tatsache, daß die kombinierte Anwendung von Harnstoff und Malonsäure bzw. Milchsäure größere Schädigungen hervorruft als diese Substanzen allein, und daß auch die Purinbasen größere Wirkung haben, könnte ein Hinweis darauf sein, daß eine Synthese von Purinkörpern aus Harnstoff und 3-C-Säuren in den Zellen stattgefunden hat.

#### b) Chromosomale Mutationen.

Es ist durchaus möglich, daß Chromosomenrestitutionen in unübersichtlichen Metaphasen der Auswertung entgangen sind. Da zuweilen sehr erhebliche Ruhekerenschädigungen festgestellt wurden, zum Teil auch die Chromosomen in überalterten Prophasen in viele Stücke zerbrochen waren (Abb. 12), ist sogar anzunehmen, daß es gelegentlich auch zu einem Wiederverheilen nicht zusammengehöriger Chromosomenbruchstücke kam. *Jedenfalls ist mit der statistischen Sicherung der Fragmentationshäufigkeit der Nachweis erbracht, daß eine Störung des Gleichgewichtes der Nucleinsäuren oder ihrer Bausteine auch Chromosomenbrüche hervorrufen kann.* Die Möglichkeit ist zunächst nicht völlig auszuschließen, daß diese auch durch das Quetschen hervorgerufen werden. Tatsächlich finden sich besonders am Rand des Präparates nicht selten Zellen, die vollständig zerquetscht sind, und deren Chromosomen „achromatische Stellen“ und „Brüche“ aufweisen. Ein gut Teil der sogenannten „totalen Zusammenbrüche“ dürfte auf einen solchen Quetscheffekt zurückzuführen sein. Die Randzone wurde deshalb tunlichst nicht auf Anomalien hin ausgewertet. Außerdem sollten die Folgen des Quetschens in Versuch und Kontrolle die gleichen sein. Wenn gleichwohl durchweg im Versuch eine höhere Bruchhäufigkeit gesichert werden konnte, so ist daraus zumindest zu schließen, daß wenigstens die Bruchbereitschaft durch die Einwirkung des Stoffes gesteigert wurde. Da die Metaphasechromosomen weitgehend aus Thymonucleinsäure bestehen, ist es durchaus anzunehmen, daß die Störungen des Nucleinsäuregleichgewichtes sich auch in einer Störung der Chromosomenstruktur und somit eventuell einer geringeren Stabilität äußern.

Die Fragmentationen verteilen sich auf die 10 kleinen und die beiden großen SAT-Chromosomen wie 149:410. Es ist bekannt, daß die Bruchhäufigkeit mit der Chromosomenlänge zunimmt. Die Längen der kleinen und großen Chromosomen zusammengenommen verhalten sich wie 5:2. Nun fallen aber Fragmentationen der SAT-Chromosomen bedeutend mehr auf als solche der anderen. So kann — um nur ein Beispiel zu nennen — jedesmal der Verlust eines Satelliten (ein nicht seltenes Ereignis!) als Fragmentation gewertet werden. Geht aber ein Stück eines

kleinen Chromosoms verloren, so kann im mikroskopischen Bild meist nicht entschieden werden, ob die augenfällige Verkürzung des Chromosoms von einer mehr vertikalen Lage oder einer Fragmentation herrührt. Da in dubio immer für den Normalfall, also hier für die optische Verkürzung, entschieden wird, ist eine Fragmentation eines kleinen Chromosoms mit darauffolgender Deletion in den meisten Fällen nicht zu diagnostizieren. Es wäre deshalb falsch, aus den angeführten Zahlen genauere Verhältnisse der Fragmentationsbereitschaft zu entnehmen. Andererseits sind die Differenzen aber so groß, daß sich eine statistische Sicherung erübrigt. Unter Berücksichtigung aller Schwierigkeiten der Auswertung kann gesagt werden: *Die beiden SAT-Chromosomen werden ungleich öfter fragmentiert als die kleinen.*

Aus den oben angeführten Zahlen geht weiter klar hervor, daß der Satellit und die Insertionsstelle der großen Chromosomen eine weitaus größere Fragmentationsbereitschaft zeigen als die übrigen Teile. Diese Beobachtung wird in Versuch und Kontrolle gemacht! LOVELESS und REVELL (1950) stellten bei Applikation verschiedener Chemikalien ebenfalls fest, daß die Verteilung der Bruchorte nicht immer nur zufallsbedingt ist. Sie konnten eine ganze Reihe von Abstufungen der Spezifität aufstellen. An deren einem Ende steht Äthylenamin mit fast zufälliger Verteilung, an deren anderem Ende Äthylenoxyd mit einem Anteil von 90% der induzierten Brüche auf einem kleinen Abschnitt. Molekülgröße, Azidität und dergleichen waren für den Effekt offensichtlich nicht bestimmend. KIHLMAN und LEVAN (1951) fanden bei der Anwendung von 8-Äthoxycoffein den Verbindungsfaden zum Satelliten bevorzugt gebrochen. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß dort und an der Insertionsstelle an das Chromosomeneiweiß keine Nucleinsäuren angelagert sind und die Festigkeit des großen Chromosoms dort deshalb bedeutend geringer ist. Ganz im Gegensatz zu diesen Befunden steht die Entdeckung von FORD (1948), der bei Senfgaseinwirkung eine Bruchhäufigkeit kurze : lange Chromosomen wie 49,5:2 feststellte, während bei X-Bestrahlung die Werte mit 5,4:2 sich der Erwartung weitgehendst näherten. Im Einklang hiermit fanden LEVAN und LOTFY (1950), daß in Wasser angekeimte *Vicia faba* zu Fragmentationen neigt, die überdurchschnittlich häufig auf den kleinen Chromosomen lokalisiert sind, und zwar fast ausschließlich auf deren proximalem Drittel. (Diese Erscheinung verliert sich nach 7 Tagen, so daß die vorliegenden Versuche davon nicht berührt sind.)

### III. Mögliche Folgerungen aus den Ergebnissen.

Durch die vorliegenden Untersuchungen ist erwiesen, daß Störungen im Gleichgewicht der Nucleinsäuren und ihrer Bausteine bzw. deren hypothetischer Vorstufen zu Strukturveränderungen der Chromosomen

führen. Daß dieser Nachweis nur an Hand von Fragmentationen geführt wurde, beeinträchtigt das Ergebnis im Prinzip nicht. Wenn auch Chromosomensätze mit größeren Fragmentationen im allgemeinen im Verlaufe der weiteren Teilungen eliminiert werden, so sind doch Fälle bekannt, in denen Stückverluste sich zumindest in der nächsten Generation noch halten und zum Teil sogar im Phänotyp manifestieren konnten (vgl. STADLER 1932 und STRAUB 1939). Nach der oben angeführten Theorie der Reduplikation des Chromosomeneiweißes kann es infolge der gestörten Struktur von Desoxyribosenucleinsäure-Ketten auch zur Bildung nicht identischer Eiweißketten, das hieße zu solchen Mutationen kommen, die im mikroskopischen Bild nicht manifest zu werden brauchen.

Als Folge der verschiedensten mutationsauslösenden Chemikalien und Strahlen beschreiben die verschiedensten Autoren cytologische Bilder (wie Verklebungen, Unterschiede in der Färbbarkeit, Strukturvergrößerungen usw.), die auf eine Störung des Nucleinsäurehaushaltes schließen lassen. Es wurde deshalb wiederholt die Ansicht geäußert, daß die mutagenen Agenzien primär in das physiologische Geschehen in der Zelle eingreifen und erst auf dem Wege über den Nucleinsäurestoffwechsel die Chromosomenveränderungen hervorrufen (DARLINGTON und KOLLER 1947, OEHLKERS 1949, MARQUARDT 1950, DARLINGTON 1951, KOLLER 1951). *Daß eine Störung der Nucleinsäureverhältnisse tatsächlich Chromosomenmutationen auszulösen vermag, ist durch die Untersuchungen von KIHLMAN und LEVAN (KIHLMAN 1949, 1950, KIHLMAN und LEVAN 1951) einerseits und die vorliegenden Befunde andererseits nun auch bewiesen.*

Solche Gleichgewichtsstörungen können auch sonst im Leben der Pflanzen (und Tiere) auftreten. Die Pyrimidin- und Purinbasen und die für den Nucleinsäureumbau verantwortlichen Fermente sind Glieder irgendwelcher noch unbekannter und wahrscheinlich sehr komplizierter Stoffwechselprozesse. Durch die verschiedensten äußeren und inneren Ursachen kann es zu Veränderungen dieser Vorgänge und in der Folge zu Störungen des betrachteten Gleichgewichtes kommen. *Somit wäre eine Ursache spontaner Mutationen durch Anlässe gegeben, wie sie in der Natur überall und immer angetroffen werden.* So hat MARQUARDT (1949) nachgewiesen, daß das Eiweißabbauprodukt Putrescin sowie Kaltextrakt aus überalterten *Oenothera*-Samen mutationsauslösend wirken.

Hinweise auf Störungen des Gleichgewichtes der Nucleinsäuren finden sich in der Literatur, die sich mit dem Krebsproblem befaßt, immer wieder. So macht KOLLER (1951) eine Überfunktion des Heterochromatins, die für Krebszellen charakteristisch ist, verantwortlich für die Steigerung der Proteinsynthese und des Nucleinsäurestoffwechsels. Bei bestimmten Tumorzellen wächst die Größe des Nucleolus, wenn die Chromosomensynthese verzögert oder unterdrückt ist. Die Prophasen

machen einen relativ geringen Anteil der Teilungsstadien aus. KOLLER glaubt, daß dies durch das große Angebot an Nucleinsäure verursacht sei, ebenso die häufige Unterdrückung der Spindelbildung. v. EULER (1940) hat gezeigt, daß die Desoxyriboside des Adenins und Guanins in Tumoren nicht weiter abgebaut werden können. PARSONS, GULLAND und BARKER (1951) fanden bei kombinierter Einwirkung verschiedener Pentose-nucleotide auf Mäuse, daß sie dieselben Effekte hervorrufen wie carcinogene Substanzen oder wie das Wachstum eines primären oder übertragenen Sarkoms selbst. Sie nehmen an, daß der Tumor solche Nucleotide im Abbauprozess freisetze; ferner, daß auch durch Bestrahlung primär ein solcher Abbau verursacht werde. Da die Nucleinsäuren für die Bildung von Chromosomen- und Cytoplasmaweiß von ausschlaggebender Bedeutung sind, ist es nicht erstaunlich, daß eine Störung ihres Gleichgewichtes auch zu dem hemmungslosen Wachstum eines Krebsgewebes führen kann.

#### IV. Sonstige Fragen.

Es seien zum Abschluß noch kurz einige Beobachtungen behandelt, die im Verlaufe der Untersuchungen neben der Bearbeitung des eigentlichen Themas gemacht wurden.

##### a) Paarung in Eu- und Heterochromatin.

Bei *Impatiens balsamina* sind in der Prophase die eu- und heterochromatischen Chromosomenabschnitte gut als solche kenntlich. Die beiden Chromatiden treten oft deutlich in Erscheinung. Dabei ist festzustellen, daß die „Paarung“ der beiden Chromatiden in den heterochromatischen Mittelstücken bedeutend enger ist als in den vorwiegend euchromatischen distalen Abschnitten (Abb. 26). In der Metaphase der C-Mitose der fast rein euchromatischen *Vicia faba* kommt es vor, daß die beiden Tochterchromosomen gepaart beieinander liegen (Abb. 4). Meist aber ist eine solche Beziehung kaum mehr konstatierbar (Abb. 5). Die entsprechenden Chromosomen der vorwiegend heterochromatischen *Impatiens* liegen fast immer paarweise (Abb. 28). Es bestätigt sich hier die Erfahrungstatsache, daß die Paarungskräfte im Heterochromatin stärker sind als im Euchromatin (vgl. STRAUB und BÖLLE 1942). FRIEDRICH-FREKSA (1940) nimmt als Ursache der Chromosomenpaarung die Anziehung der Dipole der angelagerten Nucleinsäure an (s. Schema Abb. 33). Er weist nach, daß diese Kräfte physikalisch-chemisch größenordnungsmäßig ausreichen. Es liegt auf der Hand, daß homologe Chromosomen sich so eher und gleichmäßiger paaren als nicht-homologe. Offen bleibt die Frage nach der Herkunft des Dipolcharakters. Hier bietet SERRA (1947) — in etwas abweichender Anschauung — ein Modell von Leptotänchromosomen im Querschnitt an (s. Schema Abb. 34). Da SERRA die Nucleinsäureladung der Chromosomen als die Matrix ansieht,

die Menge der angelagerten Nucleinsäuren in den heterochromatischen Abschnitten aber größer ist, wäre auch eine Verstärkung der elektrischen Ladungen und somit eine größere Anziehung im Heterochromatin zu erwarten. Selbstverständlich haben diese Vorstellungen nur den Charakter von Hypothesen, die noch unbewiesen sind und auch noch manche Frage unbeantwortet lassen.

#### b) Vergleich der Empfindlichkeit von *Vicia* und *Impatiens*.

LEVAN und LOTFY (1950) sowie KIHLMAN und LEVAN (1951) haben festgestellt, daß *Vicia*-Samen nach Ankeimung in Wasser spontan Brüche und eine größere Fragmentationsbereitschaft bei Einwirkung zeigen als solche, die in Erde angekeimt wurden. Eine hohe Empfindlichkeit von *Vicia faba* stellte auch KODANI (1948) fest: In Vorversuchen ließ er 2- und 4%-Lösungen von Na-Ribonucleat auf Wurzelspitzen einwirken. Die Wachstumshemmungen waren stärker als bei *Allium cepa*, die Pflanzen gingen bald ein. *Allium cepa* erwies sich als widerstandsfähiger. PATAU und PATIL (1951) konnten bei einer Einwirkung von 4% Na-Ribonucleat auf *Rhoeo*-Wurzeln nur 1 Fragment und keine Chromosomenbrücken feststellen. Die Anwendung derselben Substanz in der gleichen Konzentration auf *Vicia*-Wurzeln hatte — wie beschrieben — einen sehr hohen Prozentsatz von Anaphasebrücken zur Folge. Die 0,1%-Lösung, die auf Chromosomenmutationen getestet wurde, zeigte eine wesentliche Steigerung der spontanen Fragmentationsrate. In der vorliegenden Arbeit kommt die größere Empfindlichkeit von *Vicia* auch darin zum Ausdruck, daß die *Impatiens*-Wurzeln auf den schädigenden Einfluß lange nicht so stark reagieren.

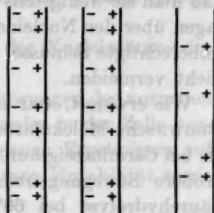


Abb. 33. Modell für die Verteilung der als Paarungskräfte wirkenden Dipole auf den Chromosomen. Nach FRIEDRICH-FREKSA (1940). Die beiden linken Chromosomen homolog, das rechte inhomolog.

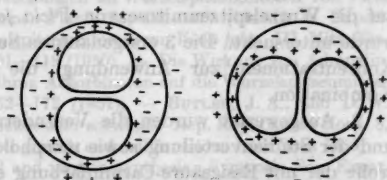


Abb. 34. Modell für das Zustandekommen einer Dipolwirkung der Chromosomen. Nach SERRA (1947). Chromosomenquerschnitte. Innen Chromatiden, außen Matrix.

#### c) Zur Nuclealreaktion.

Die Fixierung mit Carnoy und die Färbung mit Carminessigsäure sind, zumal in der Kombination des Ernstschen Gemisches, für Quetschpräparate wohl die bequemste und schnellste Methode. Ihre Anwendung

erlaubt es, größere Versuchsserien gleichzeitig durchzuführen, das fixierte Material monatelang aufzubewahren und in Ruhe auszuwerten. Demgegenüber bringt die Feulgensche Nuclealreaktion manche Komplikationen mit sich. Es hat sich aber in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß man sie wenigstens als Kontrolle verwenden sollte, wenn man Aussagen über den Nucleinsäurehaushalt machen will. Es lassen sich sonst unberechtigte Schlüsse, vor allem bezüglich der Struktur der Ruhekerne, nicht vermeiden.

Wie erwähnt, war in allen nach Feulgen gefärbten Präparaten die BROWNSCHE Molekularbewegung in einer Intensität zu beobachten, wie sie bei Carminessigsäure nie auftrat. Die Partikel müssen demnach eine größere Bewegungsfreiheit besitzen. Es ist gut möglich, daß in der Säurehydrolyse bei 60° C auch viele Bindungen gelöst werden, die Brücken zwischen den einzelnen Eiweißketten geschlagen und so eine Vernetzung des Plasmagerüsts verursacht hatten. Durch Lockerung dieser Struktur wird dann mikroskopisch sichtbaren Partikeln ein größerer Spielraum geschaffen, was sich in der beobachteten scheinbaren Intensivierung der Wärmebewegung äußert.

#### Zusammenfassung.

1. Die Einwirkung von Desoxyribose- und Ribosenucleinsäure sowie deren Bausteine Adenin, Adenosin, Thymin und ihrer hypothetischen Vorstufen l-Histidin, l-Arginin, Harnstoff, Malonsäure und Milchsäure auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba* und *Impatiens balsamina* wurde untersucht. Die 3 erstgenannten Substanzen kamen in mehreren Konzentrationen zur Anwendung, die 3 letztgenannten auch in Kombination.

2. Ausgewertet wurden die Veränderungen der Teilungshäufigkeit und der Stadienverteilung sowie morphologische Anomalien. Zur Kontrolle der mit Essigsäure-Carminfärbung erhobenen Befunde wurde die Nuclealreaktion nach Feulgen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden — soweit tunlich — statistisch gesichert.

3. Die Stoffe wirken auf die Dauer durchweg schädigend. Das Maß der Schädigung wächst mit der Konzentration. Wachstum und Teilungshäufigkeit werden gehemmt, der Anteil der Prophasen an den Mitosestadien ist durch Überalterung höher als normal. Es treten Anomalien auf wie Vergrößerung der Ruhekernstruktur bis zur Pyknose, Verzögerung der Kerneröffnung in der Prophase, abnorme Verkürzung der Chromosomen, Verklebungen und Verklumpungen, Spindelstörungen, Anaphase- und Telophasebrücken und Pseudoamitosen.

4. Spezifische Wirkung haben die Nucleinsäuren in der Vergrößerung des Nucleolus, die Ribosenucleinsäure auch in dessen verzögerter Auflösung in der frühen Metaphase. Adenin verursacht C-Mitosen.



5. Alle Substanzen verursachen eine Erhöhung der spontanen Mutationsrate, getestet an der Anzahl der Fragmentationen. Die Brüche verteilen sich ungleichmäßig über das Genom: Die SAT-Chromosomen sind weit häufiger betroffen. Bei ihnen weisen außerdem die Insertionsstelle und die sekundäre Einschnürung eine bedeutend größere Bruchbereitschaft auf.

6. Die für die Fragestellung wichtige Rolle der Nucleinsäuren im Zellstoffwechsel wird kurz behandelt.

7. Die Ergebnisse werden zurückgeführt auf Störungen des normalen Gleichgewichtes der Stoffe, die auch natürlicherweise in der Zelle vorkommen. Mögliche Folgerungen aus den gewonnenen Ergebnissen auf die Mutationsauslösung überhaupt, auf die spontane Mutabilität sowie auf das Krebsproblem werden besprochen.

8. Beiläufig gemachte Beobachtungen werden kurz behandelt: Die Ursache der verschiedenen starken Paarungskräfte im En- und Heterochromatin, die unterschiedliche Empfindlichkeit von *Vicia* und *Impatiens* und Probleme der Nuclealreaktion.

#### Literatur.

- AUERBACH, C. (1943): Zit. nach F. OEHLKERS 1949. — BAUER, H.: Die Feulgensche Nuclealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. Z. Zellforsch. 15, 225—247 (1932). — BRAUER, I.: Experimentelle Untersuchungen an Wurzelspitzenmitosen von *Vicia faba*. I. Normalverhalten. Planta 36, 411—423 (1949a). — Experimentelle Untersuchungen an Wurzelspitzenmitosen von *Vicia faba*. II. Mitt. Einfluß des Mediums. Planta 36, 466—477 (1949b). — Experimentelle Untersuchungen an Wurzelspitzenmitosen von *Vicia faba*. III. Mitt. Einfluß der Temperatur. Planta 38, 91—118 (1950). — Die Wirkung von Adrenalin, Adrenalin-Abbauprodukten sowie ihren Ascorbinaten auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*. Biol. Zbl. 70, 152—172 (1951). — BUTLER, J. A., and D. W. JAMES: The nature of deoxyribonucleic acid solutions. Rep. Roy. Cancer Hosp. 8, 8—9 (1950). — CASPERSSON, T.: Cell growth and cell function. New York 1950. — The relations between nucleic acid and protein synthesis. Symposia Soc. Exper. Biol. 1, 127—151 (1951). — DARLINGTON, C. D.: Nucleic acid and the chromosomes. Symposia Soc. Exper. Biol. 1, 252—269 (1951). — DARLINGTON, C. D. and P. C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. Heredity 1, 187—221 (1947). — DRUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. Chromosoma 4, 239—272 (1951). — DIETZEL, O.: Über die Wirkung von Nitriten auf die Zellen des EMBELICHschen Mäuseascitescarcinoms. Diss. Freiburg i. Br. 1949. — EULER, v.: Enzymatische Ergebnisse und Aufgaben in der Krebsforschung. Z. angew. Chem. 53, 352—355 (1940). — FINK, H.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Nährsalzmangels auf die Mitose der Wurzelspitzen von *Vicia faba*. Diss. Freiburg i. Br. 1947. — Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Nährsalzmangels auf die Mitose der Wurzelspitzen von *Vicia faba*. Chromosoma 3, 510—566 (1950). — FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. Proc. 8. Internat. Congr. Gen. Hereditas Suppl. 1948, 570—571. — FRIEDRICH-FREKSA: Bei der Chromosomenkonjugation wirksame Kräfte und ihre Bedeutung für die identische Verdoppelung von Nucleoproteinen. Naturwiss. 28, 376—379

- (1940). — GULLAND, J. M.: The structures of nucleic acid. Symposia Soc. Exper. Biol. 1, 1—14 (1951). — HARTE, C.: Die Anwendung der Varianzanalyse bei der Auswertung cytologischer Untersuchungen. Chromosoma 3, 567—585 (1950). — HEITZ, E.: Nucleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. Planta 15, 495—505 (1932). — HÖVERMANN, I.: Über Strukturveränderungen an Chromozentrenkernen. Planta 39, 480—499 (1951). — HOHL, K.: Experimentelle Untersuchungen über Röntgeneffekte und chemische Effekte auf die pflanzliche Mitose. Stuttgart 1949. — HUSKINS, C. L.: Experimentally produced somatic reduction and segregation. Rec. Gen. Soc. Amer. 17, 41—42 (1948). — The experimental induction of reduction divisions in somatic tissues. Roy. Soc. Canada, Sect. V, Biol. sci. 1948. — Chromosome multiplication and reduction in somatic tissues: their possible relation to differentiation, „reversion“ and sex. Nature 161, 80—83 (1948). — Segregation and reduction in somatic tissues. I. Initial observations on *Allium cepa*. J. of Hered. 39, 310—325 (1948). — The nucleus in development and differentiation and the experimental induction of „meiosis“. Proc. 8. Internat. Congr. Gen. Hereditas Suppl. 1948, 274—285. — HUSKINS, C. L., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. IV. Reductional groupings induced in *Allium cepa* by low temperature. J. of Hered. 41, 13—18 (1950). — KALCKAR, H. M.: The biological synthesis of purine compounds. Symposia Soc. Exper. Biol. 1, 38—55 (1951). — KEYSSNER, E.: Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration in der Nährlösung auf die Reaktion in der Pflanze. Planta 12, 575—587 (1931). — KIHLMAN, B.: The effect of purine derivatives on chromosomes. Hereditas 35, 393—396 (1949). — Induction of structural chromosome changes with adenine. Hereditas 36, 103—105 (1950). — KIHLMAN, B., and A. LEVAN: Localized chromosome breakage in *Vicia faba*. Hereditas 37, 382—388 (1951). — KODANI, M.: Sodium ribose nucleate and mitosis. Induction of morphological changes in the chromosomes and of abnormalities in mitotic divisions in the root meristem. J. of Hered. 39, 327—335 (1948). — KOLLER, P. C.: The experimental modification of nucleic acid systems in the cell. Symposia Soc. Exper. Biol. 1, 270—290 (1951). — LEVAN, A.: On the ubiquity of the campher reaction of yeast. Hereditas 30, 255—256 (1944). — LEVAN, A., and TH. LOTFY: Naphtalene acetic acid in the allium test. Hereditas 35, 337—374 (1949). — Spontaneous chromosome fragmentation in seedlings of *Vicia faba*. Hereditas 36, 470—482 (1950). — LOVELESS, A., and ST. REVELL: New evidence of the mode of action of „mitotic poisons“. Nature 164, 938—944 (1949). — Distribution of chemically-induced breakage in *Vicia* chromosomes. Rep. Roy. Cancer Hosp. 13, 13—14 (1950). — MARQUARDT, H.: Die Röntgenpathologie der Mitose. I. u. II. Z. Bot. 32, 401—482 (1938). — Die Röntgenpathologie der Mitose. III. Z. Bot. 36, 273—386 (1940). — Mutationsauslösung durch Putrescin-Hydrochlorid und Kaltextrakt aus überalterten Oenotherensamen. Experientia 10, 401 (1949). — Mutationsauslösung durch Abbauprodukte körpereigener Stoffe. Ärztl. Forsch. 3, 465—474 (1949). — Neuere Auffassungen über einige Probleme aus der Pathologie der Kernteilung. Naturwiss. 37, 416—424 u. 433—438 (1950). — MCCLINTOCK, B.: The origin and behavior of mutable loci in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 36, 344—355 (1950). — OEHLKERS, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Vererbungslehre 81, 313—341 (1943). — Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. Biol. Zbl. 65, 176—186 (1946). — Mutationsauslösung durch Chemikalien. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., 9. Abh. 1949. — ÖSTERGREN, G.: An efficient chemical for the induction of sticky chromosomes. Hereditas 30, 213—216 (1944). — Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. Hereditas 30, 429—467 (1944). — OHLMEYER, P.: Experimentelle Bindung von Eiweißkörpern an Zellkerne und Nucleinsäuren. Z. Naturforsch. 4b, 263—269 (1949). —

PARSONS, L. A., J. M. GULLAND and G. R. BARKER: Tissue changes in mice treated with pentose nucleotides. *Symposia Soc. Exper. Biol.* 1, 179—189 (1951). — PATAU, K., and R. PATIL: Mitotic effects of sodium nucleate in root tips of *Rhoeo discolor* HANCE. *Chromosoma* 4, 470—502 (1951). — POST, J.: Handleiding voor den opjet en de verwerking van Fischerproeven. 's Gravenhage 1946. — RESCH, A.: Untersuchungen über Differenzierungsvorgänge der Zellkerne während des Wachstums in peripheren Zellschichten der Sproßachse. *Diss.* Freiburg i. Br. 1951. — RIS, H.: The composition of chromosomes during mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12, 158—160 (1947). — SERRA, J. A.: Composition of chromonemata and matrix and the role of nucleoproteins in mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12, 192—210 (1947). — STADLER, L. J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. *Proc. 6. Internat. Congr. Gen.* 1, 274—294 (1932). — STEDMAN, E. and E.: The function of deoxyribonucleic acid in the cellnucleus. *Symposia Soc. Exper. Biol.* 1, 232—251 (1951). — STEUDEL, H.: Fütterungsversuche in der Pyrimidingruppe. *Z. physiol. Chem.* 39, 136—142 (1903). — STRAUB, J.: Die Erzeugung von Blütenpflanzen mit verminderter Chromosomenzahl (Hypodiploide). *Ber. dtach. bot. Ges.* 57, (155)—(174) (1939). — Über die Auslösung der Meiosis. *Biol. Zbl.* 70, 24—30 (1951). — STRAUB, J., u. L. BOLLE: Die Paarungskräfte im Hetero- und Euchromatin von tetraploiden *Impatiens balsamina*. *Planta* 32, 489—492 (1942). — TRÖNDLE, A.: Neue Untersuchungen über die Aufnahme von Stoffen in die Zelle. *Biochem. Z.* 112, 259—285 (1920). — WILSON, G. B., and K. C. CHENG: Segregation and reduction in somatic tissues. II. The separation of homologous chromosomes in *Trillium* species. *J. of Hered.* 40, 2—6 (1949).

Dr. E. WOLL, Freiburg i. Br., Botanisches Institut, Schänzlestr. 9—11.

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg.

## DER EINFLUSS VON CHEMIKALIEN AUF CHIASMENBILDUNG UND MUTATIONS AUSLÖSUNG BEI OENOTHERA.

Von

GERTRUD LINNERT.

(Eingegangen am 6. September 1952.)

### A. Einleitung.

Die Physiologie der Meiosis ist während der vergangenen zwei Jahrzehnte in einer Serie von Arbeiten im Freiburger Botanischen Institut untersucht worden (vgl. OEHLKERS 1937). Zunächst konnte der Einfluß äußerer und innerer Faktoren auf die Chiasmenfrequenz nachgewiesen werden. So wissen wir heute, daß Temperatur, Feuchtigkeit, Kohlenhydratspiegel die Zahl der sichtbaren Endchiasmen herauf- oder herabsetzen können, und da die Chiasmabildung der Chromosomen in der Meiosis zugleich der cytologische Vorgang ist, der dem genetischen Crossing-over zugrunde liegt, hatte man damit zugleich eine Eingriffsmöglichkeit in das Erbgefüge der Pflanzen in die Hand bekommen (ERNST 1938, OEHLKERS 1937, HARTE 1942). Gleichzeitig ist die Chiasmenfrequenz auch als ein empfindlicher *Indikator* für Veränderungen im physiologischen Zustand der Pflanzen erkannt worden (ZÜRN 1937, 1939; WIEBALCK 1939).

Als abschließende Untersuchung über den ganzen Fragenkomplex ist seit 1939 die *Chemikalienwirkung* auf die Chiasmenbildung bearbeitet worden, aus der Erwartung heraus, daß zellphysiologische aktive Substanzen ebenfalls eine Wirkung auf die Chromosomen zeigen könnten. Zunächst ergab sich dabei ein völlig unerwarteter Effekt, nämlich die Auslösung von Chromosomenmutationen, und so wurde das ursprüngliche Problem anfänglich zugunsten der neu aufgetauchten Fragen zurückgestellt. Inzwischen ist aber auch von der Mutationsfrage her wieder ein erneutes Interesse an den Gesetzmäßigkeiten der Chiasmenbildung erwachsen. Beide, die Chromosomenmutationen wie das Zustandekommen von Chiasmen beruhen auf denselben Grundvorgängen: Bruch und Wiederverheilung des Chromosomenfadens. Was lag also näher, als einmal zu untersuchen, in welcher Weise beide Phänomene auf bestimmte Chemikalien reagieren. Insbesondere führte ein Befund dazu, dieser Frage weiter nachzugehen: die reziproken Bastarde *Oenothera* (*suaveolens sulfurea*  $\times$  *<sup>h</sup>Hookeri*) und *Oe.* (*<sup>h</sup>Hookeri*  $\times$  *suaveolens sulfurea*) zeigten unter bestimmten Versuchsbedingungen Differenzen in der Zahl der Endchiasmen, und ganz entsprechend fanden sich auch

reziproke Differenzen hinsichtlich der Mutationsrate nach Anwendung eines wirksamen Äthylurethan-Kaliumchloridgemisches (OEHLKERS 1936, OEHLKERS und LINNERT 1951). So ist die Frage nahegelegt, ob diese beiden Ereignisse durch bestimmte Bedingungen gleichsinnig verschoben werden können. Darum haben wir neu an der alten Stelle wieder eingesetzt. Für die Auswertung dieser Befunde hat mir Prof. Dr. OEHLKERS auch seine alten Protokolle überlassen, so daß wir nun einen Überblick über ein Material von selten großem Umfang haben.

### B. Material und Methode.

Versuche wurden an verschiedenen Arten und Bastarden der Gattung *Oenothera* ausgeführt. Es waren die folgenden Kombinationen: 1. *Oenothera (suaveolens sulfurea* × *Hookeri*) = *flavens* · <sup>h</sup>*Hookeri*. 2. *Oenothera (Hookeri* × *suaveolens sulfurea*) = <sup>h</sup>*Hookeri* · *flavens*. 3. *Oenothera Hookeri* (7 × 2). 4. *Oenothera (suaveolens sulfurea* × *Hookeri*) *albicans* · <sup>h</sup>*Hookeri* × *Oe Hookeri* = <sup>h</sup>*Hookeri* · <sup>h</sup>*Hookeri* (7 × 2) (*Hookeri*-Genom in *suaveolens*-Plasma). 5. *Oenothera (biennis* Hann. × *Hookeri de Vries*) *albicans* · <sup>h</sup>*Hookeri* (14).

Die Versuchsanstellung ist die gleiche, wie wir sie früher schon beschrieben haben; die Versuchspflanzen werden unter Wasser in einer Länge von 45 cm abgeschnitten und dann in die vorbereiteten Erlenmeyer-Kolben mit der betreffenden Lösung gestellt. Dann standen sie in der Kältekammer bei konstanter Temperatur, Beleuchtung und Luftfeuchtigkeit bis zur Fixierung in Carnoy-Gemisch. In jedem Versuch wurden 20–25 Infloreszenzen behandelt und zur cytologischen Auswertung wurde die Analyse von je 100 Zellen angestrebt, die aus meist 3 verschiedenen Pflanzen entstammten. Manchmal wurde die Zahl 100 nicht ganz erreicht, und in den letzten Jahren untersuchten wir öfter alle Zellen, die zu finden waren, oft 200–400. In jedem Fall berechneten wir das arithmetische Mittel und die mittlere Abweichung und bei den großen Zahlen konnte die Fehlerrechnung mit Hilfe der Fehlerdifferenz erfolgen. Die Fehlerkurve ergab, daß bei der vorliegenden Streuung der Fehler des Mittelwertes bei 30 Zellen schon recht klein war, so daß die Anordnung: 3 Pflanzen mit je 30 Zellen eine recht gute ist. Da von jeder Substanz mehrere Konzentrationen untersucht wurden, erhöhte sich die Individuenzahl noch weiter. Leider ist es bei unserem Material nur schwer durchführbar, Versuchsserien mit völlig gleichen Individuen- und Zellenzahlen zu erhalten, denn in manchen Versuchen ist die Zahl der Diakinesen sehr gering und es erfordert langes Suchen, um überhaupt statistisch brauchbare Zellenzahlen zu erhalten. War die Zahl der Diakinesen je Knospe klein, dann wurden mehr Pflanzen untersucht. Es ist nicht anzunehmen, daß die Ergebnisse dadurch grundlegend geändert wurden.

Die Verarbeitung erfolgte nach der Essigkarminmethode. Die Angaben für die Versuche mit Röntgenstrahlen finden sich bei OEHLKERS und LINNERT (1950).

### C. Experimenteller Teil.

Es ist ohne Erfahrungen in einem so neuen Gebiet sehr schwierig zu entscheiden, mit was für Substanzen gearbeitet werden soll. So ist es verständlich, daß die Auswahl reichlich zufällig erfolgt ist. Es wurden, wie schon bei OEHLKERS 1943 mitgeteilt, unter der Vielfalt der zur Verfügung stehenden chemischen Verbindungen nach folgenden Gesichtspunkten einige ausgewählt: 1. Stoffe, die aus der Zellphysiologie in ihrer Wirkung auf die Permeabilität und die Hydratation des Cytoplasmas bekannt sind, wie Ionen anorganischer Salze, Säuren, Basen. Die

Konzentrationen blieben dabei aus Gründen der Erträglichkeit im hypotonischen Bereich. 2. Oberflächenaktive Stoffe wie Zucker, Saponine und Urethane. Die letzteren sind anfänglich auf Grund einer Arbeit von HÜTTIG gewählt worden, wonach durch Urethane eine Erhöhung der Postreduktionsrate bei Pilzen zustande kommt (HÜTTIG 1932), später nach der Einsicht in ihre mutagene Wirkung nach den daraus gewonnenen Gesichtspunkten. 3. Untersuchten wir noch als pflanzen-eigene, aber in der menschlichen Physiologie äußerst aktive Stoffe die Alkaloide, und außerdem kamen auch noch 4. Stoffgemische von Substanzen, die entgegengesetzte Wirkungen zeigten, zur Anwendung; so wurde die mutagene Wirkung von Chemikalien aufgedeckt. Schließlich wurde auch noch die Röntgenwirkung in unsere Versuche mit einbezogen, und endlich bedurfte es noch eines Normalversuches, einer Kontrolle. Dazu wurde die Höhe des Bindungsausfalls abgeschnit- teter Infloreszenzen in dest. Wasser unter sonst gleichen Bedingungen zum Ver- gleich herangezogen. Man erhält so bei Untersuchung ein und derselben Form, deren Infloreszenzen in der gleichen Länge abgeschnitten wurden unter stets denselben Temperatur-, Licht- und Feuchtigkeitsverhältnissen nach Ablauf der- selben Zeit ziemlich konstante Werte, jedenfalls wesentlich gleichmäßigere als die an Freilandpflanzen gewonnenen, so daß sie durchaus als Normalversuche angesehen werden können. Wir beginnen dementsprechend unsere Darlegungen mit dieser Gruppe.

### 1. Kontrollversuche mit destilliertem Wasser.

An Infloreszenzen, die abgeschnitten in destilliertem Wasser bei  $10^{\circ}\text{C}$  gehalten werden, beobachtet man ein kontinuierliches Abfallen der Chiasmafrequenz, je länger sie unter diesen Bedingungen stehen.

Tabelle 1. Die Veränderung des Bindungsausfalls während der Versuchsdauer.

Lösung	3 Tage $M \pm m$	6 Tage $M \pm m$	9 Tage $M \pm m$
Aqua destillata . . . D =	$1,38 \pm 0,061$	$1,67 \pm 0,061$	$2,82 \pm 0,110$
KSCN m/100 . . . D =	$1,46 \pm 0,088$	$2,66 \pm 0,096$	$5,04 \pm 0,222$
KSCN m/1000 . . . D =	$1,34 \pm 0,151$	$1,97 \pm 0,091$	$4,24 \pm 0,199$
Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> m/1000 . . . D =	$1,53 \pm 0,118$	$4,06 \pm 0,147$	$3,12 \pm 0,169$
Saponin 0,01 % . . . D =	$0,84 \pm 0,079$	$1,64 \pm 0,109$	$2,08 \pm 0,109$
	3 Tage $M \pm m$	6 Tage $M \pm m$	10 Tage $M \pm m$
Äthylurethan m/100 + KCl m/10 . . . D =	$1,28 \pm 0,070$	$3,08 \pm 0,157$	$3,38 \pm 0,152$
	2 Tage $M \pm m$	4 Tage $M \pm m$	6 Tage $M \pm m$
Propylurethan m/100 + KCl m/100 . . . D =	$1,50 \pm 0,132$	$2,45 \pm 0,194$	$3,80 \pm 0,183$
	4,06	5,06	4,26



Die Voraussetzung dafür ist allerdings, daß die äußeren Bedingungen, unter denen die Freilandpflanzen stehen, deren Infloreszenzen experimentell verwendet wurden, günstige sind. Bei ungünstigen Ausgangsbedingungen kann zunächst die Chiasmenfrequenz so extrem niedrig sein, daß sie im Konstanzraum bei genügender Wasserzufuhr wieder ansteigt. In dem meist gegebenen ersten Fall ist nach 3 Tagen der Bindungsausfall zwar noch nicht hoch, aber doch merklich, nach 6 Tagen deutlich höher, nach 9 Tagen ist er schon ganz beträchtlich (Tabelle 1). Bei noch längerem Aufenthalt in der Kältekammer dürften ernstliche Schädigungen vermutlich infolge des Nährstoffmangels eintreten; man findet dann kaum noch eine hinreichende Anzahl auswertbarer Zellen im Diakinesestadium. Die Veränderungen, die die Chiasmenbildung während eines Aufenthaltes in der Kältekammer erleidet, wurden schon früher untersucht und konnten hiermit wieder bestätigt werden. Aus der Summe aller Kontrollversuche mit reinem Wasser an *Oenothera (suaveolens sulfurea × Hookeri)*, deren Bedingungen eine Temperatur von 10° und eine Behandlungsdauer von 6 Tagen waren, ergab sich ein durchschnittlicher Bindungsausfall von 1,66 offenen Bindungen je Zelle. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, stimmen die Mittelwerte der verschiedenen Versuche miteinander überein. Betrachtet man aber die Mittelwerte der insgesamt 27 untersuchten Einzelpflanzen hinsichtlich ihres durchschnittlichen Bindungsausfalls, so zeigt sich, daß einige Individuen Differenzen aufweisen, die zwar gerade noch innerhalb

Tabelle 2. Kontrollen. Versuche mit destilliertem Wasser. *Oc. flavens* · *Hookeri*, 6 Tage 10° C.

Versuch	Knospe	Zahl der Zellen	$M \pm m$
40/12		38	$1,68 \pm 0,167$
41/21		50	$1,72 \pm 0,127$
41/36		20	$1,75 \pm 0,185$
41/53		100	$1,66 \pm 0,091$
42/4	1.	22	1,14
	2.	29	1,55
	3.	14	1,71
	4.	15	1,53
	$\Sigma$	80	$1,68 \pm 0,096$
42/18	1.	32	1,53
	2.	38	1,68
	3.	30	1,67
	$\Sigma$	100	$1,53 \pm 0,110$
42/20	1.	40	1,43
	2.	20	1,45
	$\Sigma$	60	$1,43 \pm 0,123$
43/28		61	$1,56 \pm 0,119$
43/35	1.	46	1,59
	2.	54	1,65
	3.	33	1,64
	4.	37	1,84
	5.	30	1,77
	$\Sigma$	200	$1,60 \pm 0,080$
46/2	1.	48	1,48
	2.	19	1,53
	3.	39	1,77
	4.	12	1,42
	$\Sigma$	101	$1,54 \pm 0,099$
49/6	1.	62	2,48
	2.	43	1,79
	3.	151	2,21
	$\Sigma$	256	2,20

Gesamtdurchschnitt  $M = 1,66$ .

der Fehlergrenzen liegen, aber bedenklich sind, und in einzelnen Fällen kommen gesicherte Abweichungen vom allgemeinen Mittelwert vor. Dieser Befund zeigt, daß die für einen Versuch verwendeten Einzelpflanzen eine ganz spezifische Reaktion auf die gegebenen Bedingungen ausführen und daß dadurch mehr oder weniger große Unterschiede in den Ergebnissen auftreten können, die manchmal sogar die Fehlergrenzen überschreiten. Daraus haben wir zu lernen, daß man über die Wirkung einer bestimmten Versuchsanordnung nur dann sichere Aussagen machen kann, wenn bei der Untersuchung auch so viele Einzelpflanzen analysiert wurden, daß eine zufällige Verschiebung der Ergebnisse auf Grund der genannten individuellen Streuung ausgeschlossen ist. Dieser Gesichtspunkt ist daher bei allen nun folgenden Darstellungen zu berücksichtigen.

## 2. Die Einwirkung von Chemikalien auf den Bindungsausfall.

### a) Anorganische Salze.

Unter den obengenannten Bedingungen einer konstanten Temperatur von  $10^0$  und bei einer Versuchsdauer von 6 Tagen wurden eine Reihe von Salzen untersucht, die als Kationen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Al}^{+++}$  enthielten, als Anionen  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  und Citrat. Davon gelangten stets mehrere Konzentrationen zur Einwirkung, wobei für jeden Versuch der Mittelwert  $M$  von geöffneten Endbindungen je Zelle aus je 100 Zellen gewonnen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt, in welcher in der 1. Horizontalen die Anionen, in der 1. Vertikalen die Kationen angeordnet sind. In den Quadraten, die in den Schnittlinien liegen, findet man die Ergebnisse der aus den betreffenden Ionen zusammengesetzten Salze. Gleichzeitig sind die verschiedenen Ionen in der Reihenfolge ihrer Quellungswirkung auf das Cytoplasma angeordnet, so daß Differenzen, die in der gleichen Reihenfolge auftreten würden, in der Tabelle sofort augenscheinlich werden müßten.

Betrachten wir nun Tabelle 3, so können wir keine solche Beziehung feststellen. Aber etwas anderes zeigt sich: zwar bewirken alle Rhodanide nur eine geringe Steigerung des Bindungsausfalls, im übrigen aber rufen offenbar die stickstoffhaltigen Verbindungen den stärksten Effekt hervor, wobei kein Unterschied besteht, ob der Stickstoff im Anion oder im Kation vorliegt, also sowohl bei den Ammoniumsalzen als auch bei den Nitraten. Ebenso zeigen auch die Aluminiumsalze eine besonders kräftige Wirkung. Natrium und Calciumsalze ebenso wie Rhodanide, Chloride und Citrate haben einen wesentlich geringeren Einfluß auf die Chiasmenbildung, doch fällt aus dieser Gruppe das KCl heraus, das wieder einen besonders hohen Bindungsausfall bewirkt. So läßt sich also *keine Beziehung zur Quellungsreihe* feststellen, wohl aber eine *spezifische Wirkung einzelner Stoffe*; auch findet sich keinerlei Konzentrations-

Tabelle 3. Der Einfluß von anorganischen Salzen auf den Bindungsausfall.

	Konzentrations	SCN <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Cl <sup>-</sup>		Citrat	
		M ± m	Diff	M ± m	Diff	M ± m	Diff	M ± m	Diff
Na <sup>+</sup>	m/100	2,35 ± 0,116	4,50 > 0,32	2,41 ± 0,130	7,69 > 2,50	2,22 ± 0,184	2,84 > 2,50	2,41 ± 0,130	4,59 > 0,37
	m/10000	2,30 ± 0,106	4,38	2,43 ± 0,154	4,23	2,13 ± 0,122	3,05 > 2,50	2,51 ± 0,116	4,75
K <sup>+</sup>	m/10	2,66 ± 0,096	7,05 > 5,27	2,52 ± 0,115	5,40 > 3,39	3,73 ± 0,121	12,88 > 0,62	2,87 ± 0,132	7,21 > 0,02
	m/100	1,97 ± 0,091	2,39 > 0,98	1,90 ± 0,142	1,50 > 1,33	3,63 ± 0,107	13,07 > 1,99	2,91 ± 0,133	7,40 > 3,91
	m/10000	1,86 ± 0,088	1,63 > 0,32	1,57 ± 0,203	0,26	3,15 ± 0,091	8,99 > 2,72	2,25 ± 0,105	4,09
	m/1000000	1,70 ± 0,090	0,49 > 0,32			2,71 ± 0,099	7,30 > 6,98		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	m/10			3,34 ± 0,123	11,33 > 0,93	1,81 ± 0,101	1,21 > 0,68		
	m/100			3,53 ± 0,164	9,60 > 5,02	3,51 ± 0,149	10,16 > 5,19		
	m/1000					2,55 ± 0,109	5,94 > 0,05		
	m/100000			2,51 ± 0,121	5,40 > 0,33	2,64 ± 0,138	5,74 > 1,76		
Ca <sup>++</sup>	m/10			2,35 ± 0,140	4,04 > 0,33	2,97 ± 0,128	7,98 > 0,24		
	m/100					2,48 ± 0,129	5,91 > 1,86		
	m/1000	2,51 ± 0,109	5,68 > 1,39	2,45 ± 0,101	5,50 > 0,40	2,17 ± 0,108	3,53 > 0,57	3,18 ± 0,112	9,24 > 4,93
	m/10000	2,27 ± 0,134	3,64 > 0,48	2,53 ± 0,173	4,39 > 0,71	2,08 ± 0,118	2,80 > 0,24	2,49 ± 0,084	6,19 > 3,24
Al <sup>+++</sup>	m/10000			2,69 ± 0,143	5,89 > 0,24			2,03 ± 0,115	2,61 > 1,43
	m/1000000	2,18 ± 0,132	3,20 > 0,48			2,12 ± 0,115	3,21 > 0,20	1,80 ± 0,113	1,08 > 0,34
	m/10					2,15 ± 0,099	3,49 > 0,74		
	m/100			3,94 ± 0,185	10,74 > 0,51	3,10 ± 0,213	6,18 > 1,56	2,39 ± 0,101	5,10 > 0,86
Al <sup>+++</sup>	m/1000			4,06 ± 0,147	13,23 > 7,2	2,72 ± 0,117	6,77 > 1,02	2,27 ± 0,098	3,7 > 0,34
	m/10000			2,63 ± 0,135	5,75 > 0,32	2,90 ± 0,132	7,98 > 0,58	2,20 ± 0,107	3,5
	m/1000000					2,79 ± 0,135	6,67 > 0,74		

Kontrolle: M = 1,63 ± 0,110; n = 100

abhängigkeit in der Wirkung der verschiedenen Salze. In unserer Tabelle wurden die Werte von  $\text{Diff}/m_{\text{diff}}$  angegeben, und zwar in der 3. Spalte im Vergleich mit dem Wert des destillierten Wassers; in der 4. Spalte wurden die aufeinanderfolgenden Konzentrationsstufen miteinander verglichen. Die erste dieser Angaben zeigt, bei welcher Konzentration eine statistisch gesicherte Differenz auftritt, und es ergibt sich, daß immer eine *bestimmte Mindestkonzentration* nötig ist, ehe eine Wirkung konstatiert werden kann, die sich von der des Wassers wirklich unterscheidet. Diese Schwelle liegt bei den einzelnen Salzen verschieden hoch und ist z. B. beim  $\text{KSCN}$ ,  $\text{KNO}_3$  und bei  $\text{NaCl}$  erst bei einer Konzentration von  $m/100$  erreicht, bei Calciumcitrat liegt sie bei  $m/1000$  und bei  $\text{KCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{AlCl}_3$  ist eine Differenz schon mit einer Konzentration von  $m/100000$  nachweisbar. Bei den übrigen Salzen kamen die niedrigen Konzentrationen nicht zur Untersuchung.

Nicht nur hinsichtlich ihrer Schwellenwerte kann man aber die einzelnen Salze unterscheiden, sondern auch an der *absoluten Größe des von ihnen bewirkten Bindungsausfalls*, und beide Phänomene brauchen nicht parallel zu laufen. So liegt z. B. der Schwellenwert des  $\text{CaCl}_2$  bei  $m/1000000$ , dagegen ist aber der Bindungsausfall in allen Fällen nur so stark erhöht, daß  $\text{Diff}/m_{\text{diff}}$  nur wenig mehr als 3 ist, einmal sogar nur 2,8. Auch bei  $\text{NaCl}$  wird die Fehlergrenze nur gerade eben überschritten. Dagegen sind bei denen, die oben schon als besonders wirksam genannt wurden, auch besonders große Differenzen zu finden, die bis zu  $D = 13,07$  wie bei  $m/100$   $\text{KCl}$  betragen können. *Ist die Schwelle der Mindestkonzentration einmal überschritten, dann ergibt sich darüber hinaus keine nennenswerte weitere Steigerung.* Die Abstufung der Konzentration erfolgte so, daß die eine immer das 10fache der vorhergehenden beträgt, und trotzdem findet sich niemals eine statistisch gesicherte Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Konzentrationen, nachdem der Schwellenwert erreicht ist. Nur bei sehr großen Konzentrationsdifferenzen, die sich um das 100fache unterscheiden, könnte man erst wieder statistisch gesicherte Differenzen aufweisen.

In einzelnen Fällen sind dagegen solche Schwankungen auffällig, bei denen die höhere Konzentration eine schwächere Wirkung zeigt als die nächst niedere, wie z. B.  $M$  für  $m/1000$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  2,55 ist, für  $m/10000$  dagegen 2,64. Solche Schwankungen deuten ebenfalls, wie an anderer Stelle schon erwähnt wurde, eine individuelle Reaktion einzelner Pflanzen an, auf deren Bedeutung später noch einzugehen sein wird.

In Tabelle 1 wird weiterhin noch dargestellt, wie sich die Wirkung verschiedener Salze nach verschiedenen Einwirkungszeiten zeigt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß ebenso wie beim destillierten Wasser der Bindungsausfall desto höher ansteigt (d. h. also, daß die Chiasmen-

frequenz desto mehr absinkt), je länger die Pflanzen unter diesen Bedingungen stehen, doch ist die Veränderung nach Salzeinwirkung noch wesentlich stärker als im destillierten Wasser.

### b) Säuren und Basen.

Die Versuche mit Säuren und Basen stammen noch aus den Jahren 1940/41 und wurden an anderen Formen von *Oenothera* untersucht, an *Oe. (Hookeri × suaveolens)* bzw. der Komplexbildung *albicans · <sup>b</sup>Hookeri*, sie sind also nicht direkt mit den eben beschriebenen Ergebnissen vergleichbar. Es wurde je eine starke (KOH bzw. HCl) und eine schwache ( $B(OH)_3$  bzw. Citronensäure) Säure und Base untersucht. Verglichen mit ihrer zugehörigen  $H_2O$ -Kontrolle bewirken diese Stoffe eine Erhöhung des Bindungsausfalls, aber diese Wirkung ist nicht größer, sondern meistens geringer als die der entsprechenden Neutralsalze (Tabelle 4). Sie zeigt, daß die Azidität allein nicht von sehr großem Einfluß ist, sondern daß es allein auf die Wirkung der Ionen ankommt. Dieser Befund ist bedeutungsvoll für die Bewertung der Salzversuche. Er beweist nämlich, daß wir keine Störung auf Grund von  $pH$ -Verschiebungen zu erwarten haben; denn natürlich sind die  $pH$ -Werte der verschiedenen Salzlösungen wegen ihrer verschiedenen Dissoziation keineswegs die gleichen.

Tabelle 4. Der Einfluß des  $pH$  auf den Bindungsausfall des Bastardes *Oe. <sup>b</sup>Hookeri · flavens.* 6 Tage  $10^\circ C$ .

Agens	Konzentration	Zahl der Zellen	Mittelwert $M \pm m$	D
Aqua destillata . . . . .		83	$1,69 \pm 0,091$	
KOH . . . . .	m/100	100	$2,50 \pm 0,084$	5,63
KOH . . . . .	m/1000	63	$2,53 \pm 0,106$	6,04
KOH . . . . .	m/10000	70	$2,47 \pm 0,109$	5,53
$Ca(OH)_2$ . . . . .	m/100	100	$3,39 \pm 0,104$	12,32
$Ca(OH)_2$ . . . . .	m/1000	100	$2,96 \pm 0,080$	10,50
$Ca(OH)_2$ . . . . .	m/10000	100	$2,93 \pm 0,094$	9,54
Citronensäure . . . . .	m/100	97	$2,49 \pm 0,095$	6,11
Citronensäure . . . . .	m/10000	40	$1,80 \pm 0,128$	0,91
HCl . . . . .	m/100	71	$2,82 \pm 0,116$	7,69
HCl . . . . .	m/10000	100	$2,06 \pm 0,106$	2,66

### c) Die Wirkung von organischen Verbindungen und ihren Kombinationen mit Neutralsalzen.

An organischen Verbindungen wurden Glucose, Saponin, verschiedene Urethane und die Alkaloide Atropin, Scopolamin, Colchicin, Morphin und Narcein untersucht. Diese Stoffe haben alle gemeinsam, daß sie die Chiasmenfrequenz entweder gar nicht oder nur in geringem Maße alterieren, und dann nur, wenn sie in sehr hoher Konzentration vorliegen,

Tabelle 5. Der Einfluß verschiedener organischer Substanzen und Gemische auf Bindungsausfall und Mutationsauslösung. *Oe. flavens* -<sup>b</sup>Hookeri. 6 Tage, 10° C.

Agens	Konzentration	Zahl der Zellen	$M \pm m$	D	Mutationsrate %
Glucose . . . . .	m/10	100	$2,35 \pm 0,123$	4,36	4
Glucose . . . . .	m/100	100	$1,65 \pm 0,095$	0,14	0
Glucose . . . . .	m/1000	85	$1,94 \pm 0,112$	1,98	1
Glucose . . . . .	m/20	100	$2,48 \pm 0,137$	4,83	4
+ KCl . . . . .	m/200				
Glucose . . . . .	m/20	100	$2,07 \pm 0,108$	2,86	10
+ KCl . . . . .	m/2000				
Glucose . . . . .	m/20	100	$2,03 \pm 0,109$	2,58	17
+ KCl . . . . .	m/20000				
Glucose . . . . .	m/200	30	$2,00 \pm 0,109$	1,55	0
+ KCl . . . . .	m/200				
Glucose . . . . .	m/2000	80	$2,24 \pm 0,109$	3,92	16,3
+ KCl . . . . .	m/200				
Saponin . . . . .	0,1 %	100	$2,13 \pm 0,153$	2,65	3
Saponin . . . . .	0,01 %	100	$1,64 \pm 0,109$	0,06	4
Saponin . . . . .	0,05 %	100	$1,55 \pm 0,125$	0,48	7
+ KCl . . . . .	m/200				
Saponin . . . . .	0,005 %	101	$2,21 \pm 0,106$	3,79	6
+ KCl . . . . .	m/200				
Saponin . . . . .	0,0005 %	100	$2,13 \pm 0,122$	3,05	4
+ KCl . . . . .	m/200				
Saponin . . . . .	0,05 %	100	$1,74 \pm 0,115$	0,69	5
+ KCl . . . . .	m/2000				
Saponin . . . . .	0,05 %	100	$1,57 \pm 0,097$	0,41	5
+ KCl . . . . .	m/20000				
Saponin . . . . .	0,01 %	100	$1,91 \pm 0,154$	1,48	11
+ KCl . . . . .	m/100	79	$2,10 \pm 0,140$	2,63	7,6
Saponin . . . . .	0,1				
+ KCl . . . . .	m/100	100	$2,83 \pm 0,148$	6,52	17
Äthylurethan . . . . .	m/10				
+ KCl . . . . .	m/10	100	$3,08 \pm 0,157$	7,55	26
Äthylurethan . . . . .	m/10				
+ KCl . . . . .	m/100	100	$2,66 \pm 0,157$	5,60	30
Äthylurethan . . . . .	m/10				
+ KCl . . . . .	m/100	100	$3,10 \pm 0,163$	7,42	18
Äthylurethan . . . . .	m/10				
+ KCl . . . . .	m/100	100	$2,50 \pm 0,134$	5,00	13
Äthylurethan . . . . .	m/10				
+ KCl . . . . .	m/1000	102	$3,11 \pm 0,143$	8,21	36
Äthylurethan . . . . .	m/20				
+ KCl . . . . .	m/200	379	$1,65 \pm 0,076$	0,88	26,4
Äthylurethan . . . . .	m/20				
+ KCl . . . . .	m/200	196	$1,64 \pm 0,088$	0,76	17,8
Äthylurethan . . . . .	m/20				
+ KCl . . . . .	m/200	100	$2,50 \pm 0,149$	4,70	27
Äthylurethan . . . . .	m/20				
+ KCl . . . . .	m/2000	103	$3,28 \pm 0,121$	10,13	9
Äthylurethan . . . . .	m/20				
+ KCl . . . . .	m/20000	100	$2,85 \pm 0,129$	7,22	14



Tabelle 5. (Fortsetzung.)

Agens	Konzentration	Zahl der Zellen	$M \pm m$	$D$	Mutationsrate %
Äthylurethan	m/100	100	$2,87 \pm 0,175$	5,99	21
+ KCl	m/100				
Äthylurethan	m/100	100	$3,07 \pm 0,158$	7,46	18
+ KCl	m/100				
Äthylurethan	m/200	100	$2,42 \pm 0,180$	3,74	7
+ KCl	m/200				
Äthylurethan	m/1000	100	$2,44 \pm 0,140$	4,55	17
+ KCl	m/100				
Äthylurethan	m/2000	100	$2,59 \pm 0,121$	5,89	12
+ KCl	m/200				
Äthylurethan	m/20	176	$2,49 \pm 0,120$	5,22	11,5
Methylurethan	m/10	45	$2,13 \pm 0,190$	2,29	2
Methylurethan	m/100	100	$2,14 \pm 0,139$	2,88	4
Propylurethan	m/10	100	$5,31 \pm 0,203$	15,93	—
Propylurethan	m/100	100	$1,91 \pm 0,126$	1,68	—
Propylurethan	m/1000	107	$2,21 \pm 0,114$	3,65	3
Butylurethan	m/10	99	$2,22 \pm 0,206$	2,54	4
Butylurethan	m/100	98	$2,15 \pm 0,108$	3,40	13
Propylurethan	m/100	100	$3,80 \pm 0,183$	10,14	23
+ KCl	m/100				

$D = \text{Diff}/m_{\text{diff}}$  im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

wie m/10 Glucose und m/10 Propylurethan. Kombiniert man nun solche Substanzen mit einem stark wirkenden Agens, wie z. B. dem KCl, dann zeigt sich ein merkwürdiger Effekt: es zeigt sich eine große Schwankung im Bindungsausfall, die offenbar regellos ist. In einer Versuchsreihe, in der die Konzentrationen von Äthylurethan und auch die von KCl in verschiedenen Kombinationen modifiziert wurden, ergab sich, daß keinerlei Zusammenhang zwischen den Konzentrationen beider Stoffe mit dem jeweiligen Bindungsausfall besteht (Tabelle 5). Dieser ist völlig wahllos einmal höher, einmal niedriger. Eine Deutung dieses Verhaltens gibt ein einzelner Versuch (1946/3) mit der Standardlösung Äthylurethan m/20 + KCl m/200, in dem eine besonders große Zahl von Zellen analysiert wurde (Tabelle 6), die aus 9 verschiedenen Knospen entnommen waren. Diese 9 Pflanzen wurden in einem einzigen Versuch am gleichen Tag geschnitten, unter völlig gleichen Bedingungen behandelt, mit derselben Lösung aus einer Vorratsflasche gespeist und zur selben Zeit fixiert. Und trotzdem zeigen sie solche statistisch gesicherte Unterschiede im Bindungsausfall, wie sie sonst nur durch kräftige experimentelle Einwirkung erzeugt werden. Die Extreme schwanken zwischen  $M = 0,65$  und  $M = 3,57$ . Es sind also auch Pflanzen darunter, die sogar vom Kontrollwert nach der positiven Seite abweichen, also deutlich mehr Chiasmen bilden als die Pflanzen im destillierten Wasser, obwohl der Durchschnittswert des ganzen Versuchs  $M = 1,65$  ist, also

Tabelle 6. Versuch 1946/3 Äthylurethan m/20 + KCl m/200.

Pflanzen-Nr.	Offene Bindung	Zahl der Zellen	$M \pm m$	D
1	125	35	$3,75 \pm 0,346$	4,74
2	88	45	$1,96 \pm 0,127$	
3	44	19	$2,32 \pm 0,315$	
4	66	38	$1,74 \pm 0,172$	4,75
5	91	46	$1,98 \pm 0,190$	
6	60	35	$1,71 \pm 0,205$	
7	65	80	$0,81 \pm 0,094$	5,14
8	30	46	$0,65 \pm 0,124$	
9	55	35	$1,57 \pm 0,233$	
Summe	624	379	$1,65 \pm 0,076$	

genau der Kontrolle entspricht. Dies kann nur so verstanden werden, daß unter Einwirkung dieses Stoffgemisches die individuelle Reaktionsmöglichkeit der Pflanzen einen besonders großen Spielraum umfaßt. Bei der geringen Individuenzahl, die bei den meisten der Kombinationsversuche verwendet wurden, mußten demgemäß bald höhere, bald niedrigere Mittelwerte auftreten. Um nun einmal diese Schwankungen an umfangreicherem Material zu erfassen und um außerdem zu sehen, ob vielleicht hinsichtlich der Größe des Spielraumes Unterschiede zwischen den untersuchten Substanzen und Substanzgemischen bestehen, versuchten wir in einer gesonderten Darstellung auch die Größe des Streuungsbereiches zu erfassen.

### 3. Die Untersuchungen über die Größe der individuellen Streuung des Bindungsausfalls unter der Einwirkung verschiedener Agenzien.

Der vorhergehende Abschnitt hat gezeigt, daß die individuelle Reaktion der Einzelpflanzen so eingerichtet sein kann, daß die Feststellung allein des Mittelwertes zu ernsthaften Fehlern führt. Sie ließ außerdem vermuten, daß hinsichtlich der Größe der Streuung Differenzen bestehen, die von der Art des einwirkenden Agens abhängig sind. Es schien uns also zweckmäßig, für alle untersuchten Stoffe auch jeweils die Schwankungen innerhalb der Einzelindividuen festzuhalten.

Um für diese Untersuchung genügend große Zahlen zu erhalten, wurden gleiche Versuche aus verschiedenen Jahren, Versuche, deren Mittelwerte statistisch gesichert übereinstimmen, und außerdem solche Versuche, bei denen der Bindungsausfall regellos war und keine Beziehung zur Konzentration der verwendeten Stoffe zeigte, zusammengefaßt, so daß sich für eine Anzahl der wichtigsten Agenzien das Streuungsmaß berechnen ließ. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt, in der in einer jeweils um 0,1 steigenden Skala die Zahl derjenigen Individuen eingesetzt ist, deren durchschnittlicher Bindungsausfall dem jeweiligen Skalenwert entspricht. Aus dieser Tabelle geht also z. B. hervor, daß bei Anwendung von destilliertem Wasser eine Pflanze einen Mittelwert von 1,1 und eine andere einen solchen von 2,5 zeigte, dagegen je 5 Pflanzen Mittelwerte von 1,5 bzw. 1,6 bzw. 1,8 und 6 Pflanzen von 1,7 zeigten. In dieser Weise wurden nun die Werte aller Einzelpflanzen, die unter Einwirkung eines bestimmten Agens erhalten wurden,

Tabelle 7. Die Streuung unter den Individuen nach Einwirkung verschiedener Agenzien.

Agenz	-0,75	-1	-1,25	-1,5	-1,75	-2	-2,25	-2,5	-2,75	-3	-3,25	-3,5	-3,75	-4	-4,25	-4,5	-4,75	n
Wasser . . . . .			1	4	15	4	1	1										26
Alkaloide . . . . .		1	2	2	2	2	1	2										12
Saponin . . . . .				2	5	7	6	2										22
Äthylurethan . . . . .				3	5	12	3	2		2								27
Glucose . . . . .				1	3	6	4	6		1								21
CaCl <sub>2</sub> . . . . .				1		2	7	3		1								14
Morphin . . . . .					2	6	2	4		2	1							17
150 r . . . . .						3	1		3	1	4							13
AeU + KCl . . . . .	1	2	1	3	7	11	8	5	11	6	8	4		1	1			50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .						1	1	1	5	2	1							11
AlCl <sub>3</sub> . . . . .						1	3	2	2	6	3							17
NH <sub>4</sub> Cl . . . . .							1	2	2	2	2	1		1	1			12
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . . . . .								3	3	3		3			1			13
KCl . . . . .									1	1	2	7		8	4			23
Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . . . . .							1	1		2	1	2				1	2	10

dargestellt, dann der Mittelwert von allen diesen Zahlen berechnet mit Hilfe des *t*-Testes die Übereinstimmung mit dem H<sub>2</sub>O-Wert als Kontrolle getestet. Durch diese Berechnung der *P*-Werte der Übereinstimmung mit den Kontrollen konnte erneut bestätigt werden, daß von den meisten anorganischen Salzen ein bedeutender Bindungsausfall erzeugt wird. Die darüber gemachten Aussagen treffen also auch dann noch zu, wenn man die individuelle Reaktion der Einzelpflanzen berücksichtigt.

Wie erwartet, zeigten sich erhebliche Differenzen in der Streubreite der verschiedenen Versuchsserien. Die statistische Behandlung dieser Frage kann durch *Berechnung der Streuverhältnisse* geschehen (Tabelle 8), die *P*-Werte dafür finden sich bei MATHER (1949, S. 263).

Tabelle 8. Die individuelle Streuung nach Einwirkung verschiedener Agenzien.

Agenz	n	M	$\sigma$	$V_1/V_2$	P
Wasser . . . . .	26	1,662	0,166	> 8,445	> 0,001
Alkaloide . . . . .	12	1,698	0,483		
Saponin . . . . .	22	1,887	0,278	> 1,80	> 0,001
Äthylurethan . . . . .	27	1,909	0,373		
Glucose . . . . .	21	2,072	0,274	> 3,156	
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	14	2,153	0,244		
Morphin . . . . .	17	2,204	0,433	> 5,98	
150 r . . . . .	13	2,484	0,595		
Äthylurethan + KCl . . . . .	50	2,571	0,685	> 4,153	= 0,001
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	11	2,583	0,302		
AlCl <sub>3</sub> . . . . .	17	2,658	0,336	> 9,762	> 0,001
NH <sub>4</sub> Cl . . . . .	12	2,911	0,498		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . . . . .	13	3,044	0,409	> 9,762	> 0,001
KCl . . . . .	23	3,446	0,312		
Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . . . . .	10	3,577	0,975		

Allerdings ergab sich dabei eine Schwierigkeit: die Streuung ist auch von der absoluten Größe des Mittelwertes abhängig, und wir kennen

nicht das Ausmaß dieser Abhängigkeit. Darum konnten immer nur Versuchsreihen mit gleichen Mittelwerten miteinander verglichen werden. Dieses Vorgehen ist vielleicht übervorsichtig, und es werden manche Differenzen deshalb nicht zum Ausdruck kommen können, weil eventuell der Vergleichsversuch selbst schon eine erhöhte Streuung besaß. Um so schwerer wiegen aber nun diejenigen Differenzen, die sich auf diese Weise statistisch sichern lassen. Auf Grund dieser Berechnungen ergab sich nun, daß die mit Alkaloiden behandelten Pflanzen eine größere Streuung aufweisen als die Kontrollen, ebenso daß Äthylurethan eine größere Streuung bewirkt als Saponin und weiter auch Röntgenstrahlen und Morphin eine stärkere als  $\text{CaCl}_2$ ; hierbei allerdings ist die Differenz nicht gesichert, weil die Individuenzahlen zu gering waren. Da  $\text{CaCl}_2$  schwach mutagen ist, wäre es möglich, daß es selbst schon die Streuung erhöht, aber in diesem Bereich des Mittelwertes fehlt ein nicht-mutagenes Agens zum Vergleich. Völlig einwandfrei ließ sich aber wiederum die Differenz der Streuungen von Aluminiumnitrat gegenüber KCl konstatieren, so daß wir wie folgt zusammenfassen können: Folgende Agenzien erzeugen besonders hohe Streuung: Alkaloide, Äthylurethan + KCl, Aluminiumnitrat, und außerdem ohne statistische Sicherung Morphin und Röntgenstrahlen. Vergleicht man die Streuungsverhältnisse aller Agenzien mit der Kontrolle, was wegen der Verschiedenheit der Mittelwerte mathematisch nicht ganz einwandfrei ist, dann kann man auch noch die Differenz von Morphin, Röntgenstrahlen und Aluminiumchlorid sichern. *So sind es also gerade die mutagenen Agenzien, chemische und auch physikalische, die die Streuung des Bindungsausfalls unter den Individuen auffallend erhöhen.*

#### 4. Der Einfluß von verschiedenen Temperaturen auf den Bindungsausfall.

Auch diese Versuche liegen schon sehr lange zurück und wurden an verschiedenen anderen Oenotheren-Formen vorgenommen. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse 4 verschiedener Versuchsreihen. Die 1. zeigte, daß bei einer Dauer von 4 Tagen der Bindungsausfall bei einer konstanten Temperatur von  $5^\circ$  ziemlich hoch ist; er fällt ab, wenn die Temperatur von  $10^\circ$  einwirkt, steigt bei  $15^\circ$  wieder etwas an, bleibt aber noch innerhalb der Fehlergrenzen. Bei Applikation von Temperaturschocks ist er höher, als es einer konstanten Durchschnittstemperatur entspräche, aber es spielt die Länge der Intervalle eine Rolle. Überwiegt die höhere Temperatur die niedrigere, dann nähert sich das Ergebnis dem der höheren konstanten Temperatur und umgekehrt.

Beträgt die Dauer der Einwirkungszeit nur 2 Tage, und werden die Intervalle der beiden Temperaturen gleich lang gehalten, dann steigt der Bindungsausfall kontinuierlich an, bis zum 6stündigen Wechsel, wenn man die Länge der Intervalle von 15 min aufwärts steigert; d. h.

Tabelle 9. Temperaturschockversuche.

Form	Einwirkung	Zahl der Zellen	$M \pm m$	Diff/mitt
<i>Hookeri</i> in <i>suaveolens</i> - Plasma	4 Tage 5° konstant	150	$1,79 \pm 0,073$	} 7,35 } 4,85 } 3,80 } 9,69 } 1,70 } 3,10 } 2,80 } 4,12 } 1,16 } 4,12 } 5,54 }
	4 Tage 10° konstant	100	$1,08 \pm 0,064$	
	4 Tage 15° konstant	85	$1,26 \pm 0,083$	
	4 Tage 5° : 15°			
	3 Std : 9 Std	70	$0,81 \pm 0,070$	} 5,54 }
	4 Tage 5° : 15°			
	9 Std : 3 Std	100	$1,39 \pm 0,077$	
	2 Tage 5° : 15°	} 100	$0,91 \pm 0,080$	} 2,37 } 2,50 } 3,59 } 3,94 } 2,01 }
	2 Tage 15 min : 15 min		$1,24 \pm 0,083$	
	2 Tage 30 min : 30 min		$1,18 \pm 0,073$	
	2 Tage 60 min : 60 min		$1,33 \pm 0,086$	
	2 Tage 3 Std : 3 Std		$1,34 \pm 0,074$	
	2 Tage 6 Std : 6 Std		$1,13 \pm 0,074$	
	2 Tage 12 Std : 12 Std			
<i>Hookeri</i> d. V.	2 Tage 5° konstant	100	$0,75 \pm 0,078$	} 2,02 } 1,33 } 2,15 } 1,24 } 0,65 } 4,53 } 1,40 } 1,52 } 2,99 } 3,70 } 0,01 } 1,35 } 0,29 } } 3,60 } 3,75 }
	2 Tage 10° konstant	100	$0,55 \pm 0,061$	
	2 Tage 15° konstant	100	$0,61 \pm 0,069$	
	2 Tage 5° : 15° je 3 Std	100	$1,16 \pm 0,063$	
	2 Tage 5° : 15° je 6 Std	100	$1,01 \pm 0,076$	
	2 Tage 5° : 15° je 12 Std	110	$0,86 \pm 0,076$	
	2 Tage 5° : 15°			
	9 Std : 3 Std	100	$0,98 \pm 0,072$	
	3 Std : 9 Std	100	$0,62 \pm 0,070$	
<i>albicans</i> · <i>Hookeri</i>	3 Tage 5° : 15° je 12 Std	100	$1,74 \pm 0,103$	} 22,79 } 1,77 } 8,83 } 19,95 } 12,25 } } 12,81 }
	6 Tage 5° : 15° je 12 Std	100	$6,89 \pm 0,150$	
	9 Tage 5° : 15° je 12 Std	41	$9,24 \pm 0,178$	
	3 Tage 5° : 15° in 0,01%	100	$1,48 \pm 0,138$	
	Saponin			
	6 Tage 5° : 15° in 0,01%	100	$4,35 \pm 0,176$	
	Saponin			
	6 Tage 10° konstant	50	$2,02 \pm 0,159$	

schneller Wechsel der Temperatur hat keine sehr starke Wirkung, jede Temperatur muß mindestens 3 Std einwirken können, ehe eine deutliche Reaktion erfolgt. Erfolgt der Temperaturwechsel aber nur alle 12 Std, dann sinkt der Bindungsausfall wieder, d. h. aber, daß auch die Anzahl der Schocks, denen die Pflanzen ausgesetzt sind, eine Rolle spielt. Ganz ähnliche Ergebnisse bringt auch die 3. Versuchsreihe, die ebenfalls nur über 2 Tage ausgedehnt worden war. Auch hier wird ein Absinken von 5–10° und ein Wiederansteigen bei einer konstanten Temperatur von 15° beobachtet. Im Schockversuch zeigt sich ebenfalls ein Überwiegen der längeren Einwirkung und eine Abhängigkeit von der Anzahl der Schocks, aber die Unterschiede sind, wohl wegen der Kürze der Versuchszeit, nicht alle signifikant.

In der 4. Versuchsreihe schließlich wurde an der Kombination *albicans* · *Hookeri*, die einen Ring von 14 besitzt, eine Schockbehandlung

von 3, 6 und 9 Tagen gegeben, wobei sich ein sehr starker Abfall der Endbindungszahl mit fortschreitender Versuchsdauer einstellt, nach 6 Tagen ist der Effekt der Schockbehandlung sehr viel größer als der der konstanten mittleren Temperatur von  $10^0$ . Hier wurde nun auch Chemikalien- und Schockbehandlung kombiniert, und es zeigte sich, daß von einer 0,01%igen Saponinlösung der Bindungsausfall nach 3 Tagen nicht alteriert ist, daß aber nach 6 Tagen eine deutliche Steigerung des Bindungsausfalls zu konstatieren ist, obwohl das Saponin bei konstanter Temperatur von 6 Tagen, wie früher gezeigt, keinen Unterschied gegenüber der Wirkung reinen Wassers bewirkt. Bei diesen Versuchen wurden vereinzelte Chromosomenmutationen vermerkt, aber sie können trotzdem für die Frage nach dem Mutationsproblem nicht herangezogen werden, da dieses damals nicht im engeren Gesichtskreis stand und auch die nötige Erfahrung noch fehlte.

##### 5. Der Zusammenhang zwischen Chiasmenfrequenz und Mutationsrate.

a) Der Vergleich der reziproken Bastarde *Oe. (suaveolens sulfurea*  $\times$  *Hookeri* FBG.) und *Oe. (Hookeri* FBG.  $\times$  *suaveolens sulfurea*).

In früheren Arbeiten (OEHLKERS und LINNERT 1951) konnte nachgewiesen werden, daß die Mutationsrate der beiden Bastarde verschieden hoch ist, wenn das Äthylurethan-KCl-Gemisch angewandt wird, und ebenfalls daß reziproke Differenzen in der Chiasmenfrequenz auftreten, wenn man extreme Bedingungen setzt (OEHLKERS 1935 und 1936). Nunmehr liegen eine Reihe von Parallelversuchen vor, bei denen beide Phänomene gleichzeitig verfolgt werden. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 10, in der für jeden Versuch jeweils der Mittelwert geöffneter Endbindungen  $M$  und die Mutationsrate gegenübergestellt sind, und die Signifikanz der Differenzen zwischen den beiden Bastarden im 1. Fall mittels  $D = \frac{\text{Diff}}{m_{\text{diff}}}$  und hinsichtlich der Mutationsrate mit Hilfe der  $\chi^2$ -Methode berechnet wurden. Wie früher schon gezeigt, findet sich eine reziproke Differenz in der Mutationsrate bei den Versuchen mit Äthylurethan und KCl. Gerade in diesen beiden Versuchen aber ist der Bindungsausfall  $M$  einmal beim Bastard im *suaveolens*-Plasma und das andere Mal bei dem Bastard im *Hookeri*-Plasma höher, wobei die Differenzen nicht gesichert sind. Vergleicht man die Reihe der übrigen Versuche, die alle gleiche Mutationsraten aufwiesen, dann finden sich in 3 Fällen größere Differenzen, von denen 2 statistisch gesichert sind, aber auch hier ist 2mal der Bindungsausfall im *suaveolens*-Plasma höher und 1mal der im *Hookeri*-Plasma. Damit ist also eindeutig nachgewiesen, daß Chiasmafrequenz und Mutationsrate niemals durch bestimmte Versuchsbedingungen gleichsinnig verschoben werden. Die in diesen Versuchen ab und zu gefundenen Differenzen im Bindungsausfall



Tabelle 10. Vergleich von Bindungsausfall und Mutationsrate an den reziproken Bastarden *Oe. flavens* · *bHookeri* und *bHookeri* · *flavens*.

Agens	Konzentration	Form	Zahl der Zellen	$M \pm m$	D	Mutationsrate %	P
Aqua destillata		s × H	256	$2,20 \pm 0,101$	0,11		
		H × s	129	$2,22 \pm 0,140$			
Leitungswasser		s × H	101	$1,54 \pm 0,100$	0,06		
		H × s	99	$1,53 \pm 0,130$			
Äthylurethan KCl	m/20 m/200	s × H	196	$1,64 \pm 0,080$	2,22	17,8	0,0027
		H × s	379	$1,44 \pm 0,050$		9,7	
		s × H	379	$1,65 \pm 0,080$	2,50	26,4	10 <sup>-2,3</sup>
		H × s	458	$1,90 \pm 0,060$		11,6	
150 r		s × H	106	$3,11 \pm 0,150$	3,03	21,5	0,99
		H × s	101	$2,40 \pm 0,180$		21,9	
		s × H	125	$1,92 \pm 0,127$	0,88	14,7	0,78
		H × s	84	$2,10 \pm 0,160$		17,5	
150 r + KCl	m/200	s × H	131	$1,89 \pm 0,12$	0,53	10,2	0,98
		H × s	133	$1,98 \pm 0,12$		10,7	
150 r + Äthylurethan	m/20	s × H	117	$1,37 \pm 0,10$	0,13	26,0	0,06
		H × s	129	$1,35 \pm 0,11$		15,1	
Morphin	m/1000	s × H	154	$1,87 \pm 0,10$	5,37	29,2	0,01
		H × s	127	$2,75 \pm 0,13$		42,2	
		s × H	237	$2,01 \pm 0,09$	0	17,3	0,60
		H × s	227	$2,01 \pm 0,10$		14,9	
Narceïn	m/1000	s × H	91	$1,71 \pm 0,13$	0,1	12,0	0,76
		H × s	88	$1,69 \pm 0,152$		14,7	
Scopolamin	m/1000	s × H	110	$2,35 \pm 0,15$	2,76	9,1	0,93
		H × s	92	$1,80 \pm 0,13$		8,0	
Atropin	m/1000	s × H	91	$1,42 \pm 0,12$	0,06	11,7	0,97
		H × s	93	$1,41 \pm 0,12$		12,6	
AlCl <sub>3</sub>	m/1000	s × H	213	$2,11 \pm 0,09$	0,94	13,8	0,60
		H × s	214	$1,99 \pm 0,09$		11,5	

Der Bindungsausfall wurde nur an den nichtmutierten Zellen ausgezählt. Zum besseren Vergleich ist die Mutationsrate hier in Prozenten angegeben,  $P_{hom}$  wurde aber an Hand der absoluten Zahlen nach der  $\chi^2$ -Methode berechnet. (Vgl. OEHLKERS und LINNERT 1950).

sind wohl viel mehr mit einer erhöhten Streuung zu erklären, die im vorhergehenden Abschnitt aufgewiesen worden ist.

#### b) Die Korrelation zwischen Chiasmenfrequenz und Mutationsrate.

Noch auf eine andere Weise ist die Beziehung zwischen den beiden Erscheinungen nachzuprüfen, durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten. Die insgesamt 118 Mutationsversuche aus den vergangenen Jahren wurden hier zusammengefaßt und in eine Tabelle

Tabelle 11. Die Korrelation zwischen Chiasmafrequenz und Mutationsrate.

Mutations- rate %	Zahl der geschlossenen Bindungen							
	9,5-10	10-10,5	10,5-11	11-11,5	11,5-12	12-12,5	12,5-13	13-13,5
0-10	—	3	4	15	19	23	5	1
10-20	1	—	3	5	11	11	3	—
20-30	—	1	3	2	3	2	1	—
30-40	—	—	1	—	—	—	—	—
über 40	—	—	—	1	—	—	—	—

Korrelationskoeffizient  $r = -0,1655 \pm 0,0892$ .  $P = 0,1$ .

eingeordnet, die in der Horizontalen die Mittelwerte der Chiasmenfrequenz bei einer Steigerung um jeweils 0,5 Chiasmen je Zelle anordnet (Tabelle 11). [Wir geben hier, des besseren Verständnisses halber, nicht wie sonst den Durchschnitt des Bindungsausfalls, sondern den der geschlossenen Endbindungen an. Diese Zahlen entsprechen also dem Wert 14-M (Bindungsausfall). Im übrigen ändert sich durch diese Manipulation nichts an den Befunden, Streuung und mittlerer Fehler sind genau die gleichen.] Die Mutationsraten sind in 4 Stufen gegliedert, die sich jeweils um 10% steigern. Der an Hand dieser Korrelationstabelle berechnete Korrelationskoeffizient beträgt 0,1666;  $P = 0,1$ . So ist also auch auf diese Weise klar geworden, daß zwischen Chiasma-bildung und Mutationsgeschehen keinerlei Korrelation besteht (vgl. auch MARQUARDT 1952). Eingriffe bestimmter Agenzien müssen also die beiden Phänomene auf verschiedene Weise treffen.

#### D. Diskussion.

Die vorliegende Arbeit stellt das Endglied einer Serie von Publikationen dar, die unter dem Titel „Physiologie der Meiosis“ im Freiburger Institut erschienen sind. Seit dem Beginn dieser Serie haben sich allerdings die Probleme geändert, manche Frage ist geklärt, manche neu aufgetaucht. Die Untersuchung des Chemikalieneinflusses auf die Chiasmenfrequenz gehört ursprünglich in die Reihe der Untersuchungen des Einflusses äußerer und innerer Faktoren auf dieses Phänomen und führt gleichzeitig einen Schritt tiefer in Probleme der physikalisch-chemischen Zellstruktur. Bei der Grobheit der chemischen Methoden, die gegenwärtig zur Untersuchung des Aufbaues der Zelle und ihres Kernes zur Verfügung stehen, sind wir immer noch darauf angewiesen, möglichst vielfältige biologische Methoden heranzuziehen, die über die Aktion bestimmter Agenzien im Organismus möglichst vielseitigen Aufschluß geben. Dazu kann die Mutationsauslösung dienen, wie auch die Chiasmenbildung, aber auch auf ganz anderem Feld die Untersuchung der Bewegungs- und Formungsprozesse oder die Permeabilitätszustände in der Zellhaut. Alles das sind Vorgänge, an denen

durch experimentelle Eingriffe Gesetzmäßigkeiten erfaßt werden können, denen Zelle und Kern ebenso folgen wie der ganze Organismus.

### 1. Die Bedeutung der physiologischen Gesamtstruktur der Pflanze für das Verhalten der Chromosomen.

Alle Beobachter, die einen bestimmten cytologischen Prozeß im Auge haben, finden bei den verschiedensten experimentellen Eingriffen immer wieder unspezifische Reaktionen. Obwohl vielfach nach spezifisch wirkenden Agenzien gesucht wird, können solche nur langsam, sozusagen Schritt für Schritt aufgedeckt werden. Erste Ansätze dazu finden sich bei OEHLKERS (1952). Im allgemeinen zeigt sich, daß durch die verschiedenen Einwirkungsarten eine bestimmte Ursache-Folge-Kette irgendwo unterbrochen wird, so daß doch am Ende immer wieder dasselbe Ergebnis steht. Experimentiert man mit Pflanzen und untersucht danach die Chiasmenfrequenz, dann zeigt sich, daß die verschiedensten physiologischen Veränderungen einen Einfluß darauf haben können: Hydratation, Temperatur, Kohlenhydratspiegel und Salzgehalt, aber auch der Zustand des Plasmas und der Plastiden und der Chromosomen selbst (OEHLKERS 1935, 1936, 1937; STRAUB 1936, 1937; HASELWARTER 1937; KISCH 1937; ZÜRN 1937 a und b, 1939; WIEBALCK 1940). Es ist anzunehmen, daß letzten Endes alle diese Faktoren nur einen der vielen Teilvorgänge beeinflussen, die in ihrer Gesamtheit für die Chiasmenfrequenz verantwortlich sind. Ebenso lassen sich die Verhältnisse für die Mutationsauslösung vorstellen.

Soweit die Unspezifität der Reaktionen. Indessen ist es innerhalb der eben entwickelten Vorstellung aber auch durchaus begreiflich, daß sich bei verschiedenartigem Substrat auch differente Reaktionen ergeben können. So spricht *Vicia faba* vor allem auf Temperaturschwankungen an, *Campanula* auf Veränderungen im Wassergehalt, *Rhoeo discolor* auf tiefe und *Gasteria* auf hohe Temperaturen (STRAUB 1936, 1937). Es besteht dabei ein Zusammenhang mit der Ökologie der betreffenden Formen derart, daß z.B. die sukkulente *Rhoeo* nicht auf Wasserentzug und hohe Temperaturen reagiert, wohl aber die an gemäßigtes Klima gewöhnte *Campanula*.

Zu diesen mit den Gattungs- und Artdifferenzen sowie den ökologischen Charakteren solcher Typen gegebenen Verschiedenheiten kommen nun noch Unterschiede individueller Reaktionen. Schon KISCH (1937) konstatierte Unterschiede unter Einzelpflanzen, die bei unseren Versuchen ebenfalls deutlich waren. Wenn auch Pflanzen der gleichen genetischen Konstitution für einen Versuch auf demselben Feld den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren, können trotzdem noch Schwankungen in der Versorgung und Entwicklung wirksam geworden sein, die mit groben Methoden nicht wahrnehmbar sind. Es zeigt sich aber, daß

die Chiasmenbildung oder die Mutabilität offenbar besonders empfindliche Systeme sind, die auch auf Unterschiede individueller Schwingungsweite ansprechen. Daraus ergibt sich, daß in diesen Fällen nicht die Versuchsbedingungen für solche Unterschiedlichkeiten verantwortlich sind, sondern eine spezielle physiologische Struktur.

Von der Einwirkung eines Agens auf die ganze Pflanze bis zur Reaktion an den Chromosomen spielt sich eine Kette von ineinander greifenden Reaktionen ab, die durch 3 Bereiche hindurchgeht: 1. durch den der vegetativen Teile Wurzel, Stengel und Blätter, 2. durch den Bereich der für Meristeme zuständigen Nährgewebe und 3. durch den der Zelle selbst, von deren Einzelorganellen noch mannigfaltige Wirkungen auf Kern und Chromosomen ausgehen können. An jeder beliebigen Stelle dieser 3 Bereiche können experimentell verwendete Agenzien angreifen und sich von hier aus schließlich auch an den Chromosomen auswirken, und so ist es unsere Aufgabe, soweit wie möglich Wirkungsweise und Angriffspunkte der verwendeten Chemikalien zu analysieren.

## 2. Die Wirkungsweise der angewandten Chemikalien.

Die zur Debatte stehenden Substanzen sind entweder solche, die auch normalerweise zur Ernährung der Pflanzen dienen, wie die anorganischen Verbindungen, oder solche pflanzlicher Herkunft — obwohl sie gerade von *Oenothera* nicht gebildet werden —, die Alkaloide, oder aber, wie das Urethan, eine Substanz von bekannter hoher physiologischer Aktivität; von allen den von uns untersuchten Substanzen müssen wir also erwarten, daß sie außer einer möglichen direkten Einwirkung auf die Zelle bzw. die Chromosomen auch eine physiologische Aktivität entfalten und so auf indirektem Wege einen cytologisch faßbaren Effekt auslösen. Dies wird in jedem Fall schwer zu unterscheiden sein. Ihre Wirkungsweise ist, mindestens in den verwendeten Konzentrationen, eine verhältnismäßig milde, schwere Schäden wie Pyknose, Entspiralisierung oder Spindelstörung finden sich kaum, wie auch nie eine letale Wirkung konstatiert wurde. Eine Verlangsamung des Meiosisablaufs oder ein Steckenbleiben im Pachytän dürfte wohl vorkommen, aber diese Effekte treten als Folge besonderer Versuchsanstellungen auch in den Wasserkontrollen auf. Auch die milde Art der Einwirkung spricht dafür, daß die angewandten Agenzien wohl mehr quantitative Veränderungen normaler Prozesse verursachen, die keine allzu groben Eingriffe darstellen.

Die Applikationsweise der Chemikalien verdient eine nähere Betrachtung. Abgeschnittene Infloreszenzen standen in den Versuchslösungen; diese gelangen also durch die Gefäße ohne Hindernis bis in die Antheren hinein. Nur das Konnektivgewebe und das Tapetum sind zu durchdringen, um an die Pollenmutterzellen heranzukommen. So dürfte also der Weg bis zum Wirkungsort bei der Meiosis kaum länger sein als bei der Wurzelspitzenmitose, wo die Wurzelhaare,

die Streckungszone und das halbmeristematische Gewebe von den Substanzen durchwandert werden müssen. In beiden Fällen aber stehen lebende Zellen im Weg, die als Filter wirken können. Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Versuchslösungen unverändert an die sich teilenden Zellen herankommen, vielmehr dürfte ein Teil von ihnen zurückgehalten oder verändert werden und womöglich entstehen in den Filterschichten unter Einwirkung der Versuchslösungen neue Substanzen, die zu den teilenden Zellen gelangen. Die Notwendigkeit, durch lebende Zellen durchzugehen, erklärt wohl auch die Beziehung, die LEVAN (1949) zwischen Lipoidlöslichkeit und cytologischer Wirkung bei seinen Substanzen findet. Aber noch weitere Umstände müssen beachtet werden. Unsere Substanzen geraten natürlich durch die Leitungsbahnen auch in die Blätter, um dort Wirkungen zu entfalten. Sie können so in die Assimilation und die Atmung, kurz in alle Stoffwechselvorgänge eingreifen, die sich an irgendeiner Stelle des vegetativen Systems abspielen, und so veranlassen, daß neue Stoffe entstehen oder daß Zwischenprodukte angereichert werden. Diese aber können ihrerseits wiederum eine Wirkung auf die Pollenmutterzellen ausüben.

Die eben gegebene Ableitung läßt nun folgendes Problem verständlich werden. In destilliertem Wasser ist die Zahl der Zellen, die im Diakinesestadium gefunden werden, sehr gering, auch wenn kaum eine Schädigung konstatiert wird. Das ist offenbar ein Hungereffekt. Ein solcher bleibt aber stets dann aus, wenn Äthylurethan appliziert wird: man findet in solchem Fall reichliche Zellen im Stadium der Diakinese, was um so erstaunlicher ist, weil es mutagene Wirkung besitzt. Das ist folgendermaßen zu erklären: Äthylurethan verändert die Permeabilität auch der vegetativen Zellen, so daß Nährstoffe aus diesen austreten können, die dann möglicherweise den Pollenmutterzellen zugute kommen und den Hungereffekt ausschalten. Daß ebenso wie die Nährstoffe auch andere Stoffwechselzwischenprodukte austreten und in das Leitungssystem gelangen, versteht sich von selbst. Im folgenden wollen wir dazu übergehen, die Salzwirkung zu behandeln. Bevor das geschieht, seien noch einige allgemeinere Überlegungen kurz vorausgeschickt.

Die Salzlösungen, die als wirksame geprüft wurden, sind als einfache Lösungen den abgeschnittenen Infloreszenzen dargeboten worden. Das bedeutet natürlich eine Mangellösung, weil alle anderen Nährlösungsbestandteile fehlen. Infolgedessen wird der betreffende Stoff im Überschuß in das Stoffwechselgetriebe hineingezwungen. Er kann dementsprechend zweierlei Wirkungen haben, einmal eine direkte Ionenwirkung, oder aber eine Gleichgewichtsverschiebung in dem sonst normalen Stoffgetriebe, die sich im einzelnen nur schwer übersehen läßt. Endlich sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die Salze in Konzentrationen gegeben wurden, die unter den üblichen osmotischen Werten des Zellsaftes liegen.

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß nahezu alle anorganischen Verbindungen nach längerer Einwirkungszeit eine Herabsetzung der Chiasmenfrequenz bewirken; sie zeigen also eine *höchst unspezifische Reaktion*. Es ist ferner weder eine Konzentrationsabhängigkeit konstatierbar, noch eine Beziehung zu Ionenreihen oder zur Azidität. Also muß nach einem indirekten Effekt gesucht werden. Ein solcher bietet sich in der *Hydratation der Zelle*. Es wäre denkbar, daß die Wirkung der

Salze auf den Bindungsausfall über einen Einfluß auf den osmotischen Zustand der Zellen geht; denn die Beziehung zwischen der Hydratation der Zellen und der Chiasmenfrequenz ist bereits mit anderen Methoden (KISCH 1937) nachgewiesen worden.

Eine weitere, ebenso allgemeine und unspezifische Wirkung der Salze ist das Fehlen einer Konzentrationsabhängigkeit. Das aber ist gerade aus der oben erwähnten hypotonischen Dosierung verständlich. Die Stoffe werden unter diesen Umständen vermutlich in den Zellen aktiv, d. h. in einem verarbeiteten Zustand angereichert und kommen dadurch in ganz anderer Konzentration und Form zur Wirkung.

Weiter seien noch einige besondere, man könnte sagen spezifische Wirkungen vermerkt. Einmal die auffallend starke Wirkung der Stickstoffverbindungen ohne Rücksicht auf ihre Ladung. Es scheint demnach, daß Stickstoff eine besondere Rolle spielt, und so stimmen unsere Versuche auch mit denen von HESSE, PIRVITZ und DIETZEL (1949) überein, die, von der Überlegung ausgehend, daß salpetrige Säure mit den primären Aminogruppen am Eiweiß reagiert, und so auch auf Nucleinsäuren wirken kann,  $\text{HNO}_2$  absplattende Substanzen als Vektoren auf Ehrlich-Ascitestumoren einwirken ließen und dabei einen klaren Zusammenhang zwischen  $\text{HNO}_2$ -Abspaltung und Mitosehäufigkeit nachweisen konnten. Salpetrige Säure wurde in unseren Versuchen zwar nicht angewandt, wenn wir indessen mit Nitraten und Ammoniumionen einen starken cytologischen Effekt erhalten, dann ist das möglicherweise so zu verstehen, daß in der Pflanze eine Umwandlung dieser Verbindungen erfolgt ist.

Eine fast noch auffallendere Wirkung als die Stickstoffverbindungen besitzen die Aluminiumsalze. Sie zeigen nicht nur die höchsten Werte an offenen Endbindungen, sondern auch die größte Streuung und eine starke mutagene Wirkung. Mag sein, daß diese Effekte auf dem Wirkungsmechanismus der Schwermetalle beruhen, die mit den SH-Gruppen der Eiweißverbindungen reagieren wie HESSE und seine Mitarbeiter angeben. Es läßt sich aber auch denken, daß der primäre Vorgang, wie ALEŠIN und JASTREBOW (1950) vermuten, die Bildung von unlöslichem Aluminiumphosphat ist, wodurch eine ionenadsorbierende Schicht entsteht, die an der Wurzeloberfläche des Weizens von den Autoren vermutet wird. In unseren Versuchen müßte sich entsprechend eine solche Schicht an der Innenseite der Leitungsgefäße bilden. Die Reaktion hätte dann mit den bei Versuchsbeginn in den Leitungsbahnen vorhandenen Phosphationen zu erfolgen. Eine 3. Erklärungsmöglichkeit ergibt sich möglicherweise aus der Tendenz des Al-Ions, mit Kohlenwasserstoffen katalytisch wirksame Verbindungen einzugehen. Auch hier wird wieder deutlich, daß neben einer direkten Einwirkung auf die Eiweißverbindungen des Zellkerns auch mehrere indirekte Wirkungs-



weisen denkbar sind, die auf dem Umweg über eine allgemein-physiologische Aktion Einfluß auf das Geschehen an den Chromosomen nehmen können.

Zum Schluß sei noch auf die organischen Agenzien ein Blick geworfen, die ihrerseits kaum einen Einfluß auf die Chiasmenfrequenz besitzen, wohl aber eine ungemein starke mutagene Wirkung besitzen. Hier ist das Vorherrschen von Narkotika und oberflächenaktiven Substanzen auffallend, so daß eine Wirkung auf fermentgebundene Prozesse angenommen werden kann. Die umfangreichen Untersuchungen von WARBURG (1928) haben den Einfluß des Urethans auf diese Prozesse klargestellt.

### 3. *Asynapsis oder Desynapsis.*

Der Ausfall von Endchiasmen in der Diakinese kann auf verschiedene Weise zustande kommen: entweder durch Ausbleiben der Chromosomenpaarung oder durch Verringerung der absoluten Zahl gebildeter Chiasmen, oder schließlich durch erhöhte Terminalisationsgeschwindigkeit, so daß trotz gebildeter Chiasmen sich die Endbindungen vorzeitig lösen. So fand STRAUB (1936), daß bei *Campanula* und *Gasteria* der Chiasmaausfall auf Verringerung der Zahl der im Pachytän gebildeten Chiasmen beruht, während HASSELWARTER bei *Rhoeo* in frühen und späten Diakinesen verschieden viele Chiasmen findet und daher annimmt, daß hierbei die Endbindungen vorzeitig gelöst werden. Für *Oenothera* läßt sich diese Frage nicht entscheiden, da die frühen Stadien nicht zugänglich sind. So müssen wir also auch die Frage unbeantwortet lassen, ob möglicherweise das Zustandekommen einer größeren Streuung durch Veränderung der Terminalisationsgeschwindigkeit zu erklären ist oder ob Dauer und Intensität der Chromosomenpaarung in Mitleidenschaft gezogen werden.

### 4. *Der Zusammenhang zwischen Mutationsauslösung und Chiasmenbildung.*

Der Vorgang der Chromosomenmutation ist morphologisch ebenso wie der der Chiasmaentstehung ein Brechen und Wiederverheilen von Chromonemata, beide Prozesse sind also durchaus vergleichbar. Sie lassen sich in 2 Schritte zerlegen, sind also in der Art und Weise ihrer Durchführung identisch. Sie unterscheiden sich einmal darin, daß die Chromosomenmutationen als Brüche ganzer Chromosomen, Chromatiden, Halbchromatiden und von noch kleineren Spaltprodukten zustande kommen, die Chiasmaformation hingegen nur zwischen Chromatiden erfolgt; zum anderen dadurch, daß bei der Entstehung von Chiasmen stets nur Bruchflächen von homologen Chromatiden unter Beibehaltung der ursprünglichen Längsstruktur miteinander verheilen, bei

Chromosomenmutationen jedoch die Bruchrestitution nach Einwirkung mutagener Agenzien an jeder beliebigen Stelle zwischen homologen wie nichthomologen Chromosomenteilen, ohne Rücksicht auf die Längsstruktur eintreten kann. Ferner werden die Chiasmen nur im Pachytän der Meiosis gebildet, Chromosomenumbauten erfolgen dagegen in den Ruhekernen und Prophasen aller teilenden Kerne ebenso wie im Pachytän. Obwohl also beide Vorgänge denselben Grundprozeß zum Gegenstand haben, so läßt es doch die Art ihrer Abläufe und der Verschiedenartigkeit der Orte ihres Vorkommens möglich erscheinen, daß sie nicht sehr eng miteinander verknüpft zu sein brauchen.

Einige reale Zusammenhänge bestehen in der Tat. Man findet hinsichtlich der Chiasmenfrequenz eine reziproke Verschiedenheit bei den Bastarden *flavens* · *<sup>h</sup>Hookeri* und *<sup>h</sup>Hookeri* · *flavens* derart, daß bei Kälteeinwirkung die Bindungszahl der letzteren stärker absinkt als bei derselben Genkombination im *suaveolens*-Plasma mit *suaveolens*-Plastiden. Es hat sich nachweisen lassen, daß das mit einer verschiedenen Ausbildung der Plastidenfarbstoffe und entsprechend verschiedener Assimilationsleistung zusammenhängt (KISCH 1937). Behandelt man dieselben Bastarde mit Äthylurethan-KCl-Gemisch, dann erhält man die größere Mutationsrate beim Bastard im *suaveolens*-Plasma; hier entsprechen sich beide Phänomene vollständig: im *suaveolens*-Plasma herrscht größere Bruch-Restitutionsneigung ebenso hinsichtlich der Chiasmabildung wie der Chromosomenumbauten. Diese Parallelerscheinung ist aber an ganz verschiedenartige Bedingungen geknüpft: das Chiasmaphänomen an die Einwirkung extrem tiefer Temperaturen, die Differenz in der Mutationshäufigkeit an die Einwirkung von Äthylurethan-KCl. Werden in ein und demselben Versuch Mutationsrate und Chiasmenhäufigkeit ausgezählt, so ergibt sich *keine Parallele* zwischen beiden Effekten, weder mit Äthylurethan noch mit anderen mutagenen Agenzien; hier ist vielmehr bei gleichem Bindungsausfall die Mutationsrate bzw. bei gleicher Mutationsrate der Bindungsausfall verschieden. Zu entsprechenden Ergebnissen gelangte auch MARQUARDT (1952), der Versuche mit Zephirol und Röntgenstrahlen an *Oe. Hookeri* in dieser Hinsicht anstellte. So ist also klar, daß niemals durch bestimmte Agenzien eine gleichsinnige Verschiebung beider Phänomene zustande kommt; MARQUARDT (1951) fand sogar einmal eine negative Korrelation, d. h. Koppelung von Mutabilität mit Bindungsausfall. Auch ein solcher Effekt ist theoretisch wohl denkbar: Es kann beispielsweise durch ein Agens der DNS-Kreislauf gestört werden, wodurch wiederum Mutationen entstehen können (DARLINGTON und LA COUR 1945), aber auch gleichzeitig erhöhter Chiasmaausfall (KOLLER 1946). Wird dagegen ein anderer Prozeß primär gestört, dann ist es wohl möglich, daß eine umgekehrte Beziehung sichtbar wird.

Unsere bisherigen Kenntnisse hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Chiasmenbildung und Chromosomenmutation erfahren nun noch eine Erweiterung durch unsere Befunde über die Erhöhung der Streubreite der Chiasmenfrequenz nach Chemikalieneinwirkung. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß es eine besondere Eigenschaft vor allem der *mutagenen* Agenzien ist, innerhalb gleicher Versuchsbedingungen bei dem einen Individuum die Chiasmafrequenz zu erhöhen, beim anderen zu erniedrigen. Dieser sehr merkwürdige Effekt ist nicht ganz einfach zu deuten. Ganz allgemein läßt sich sagen, daß Mutabilität oft mit besonderer Labilität in der Ausbildung von Chiasmen gekoppelt ist. So ergibt sich also doch ein innerer *Zusammenhang* der beiden Phänomene trotz ihrer *Unabhängigkeit* in der Ausprägung. Beiden Effekten müssen also entweder Prozesse zugrunde liegen, die in irgendeiner Weise ineinander verschränkt sind, oder aber die mutagenen Agenzien besitzen eine vielfältige Wirkung mit verschiedenen Angriffspunkten. Mehr läßt sich gegenwärtig über dieses Phänomen nicht aussagen. Seine Signifikanz ist aber so auffällig, daß es ganz zweifellos ein *entscheidendes Merkmal der Mutationsauslösung* ist.

#### Zusammenfassung.

Anorganische Salze, Säuren, Basen sowie Urethane, Saponin, Zucker und Alkaloide und vergleichsweise auch Röntgenstrahlen wurden in ihrer Einwirkung auf die Meiosis von *Oenothera* untersucht. Die Betrachtung der Chiasmabildung und des Mutationsgeschehens erbrachte folgende Ergebnisse:

1. Anorganische Salze erniedrigen allgemein die Chiasmafrequenz nach Untersuchungen an der Diakinese. Dabei besteht keine Konzentrationsabhängigkeit, vielmehr genügt die Überschreitung einer bestimmten Schwelle, um eine Reaktion auszulösen, über die hinaus kein nennenswerter weiterer Erfolg mehr eintritt. Differenzen unter den gebotenen Stoffgruppen bestehen hinsichtlich der absoluten Höhe der Chiasmenfrequenz, denn Stickstoffverbindungen und Aluminiumsalze zeichnen sich durch auffallend kräftige Wirkung aus.
2. Die Konzentration der Wasserstoffionen hat keinen besonderen Einfluß und schwache Säuren und Basen, in ertragbaren Konzentrationen geboten, wirken schwächer als manche Neutralsalze.
3. Die organischen Verbindungen zeigen keinen besonders nachdrücklichen Einfluß auf die Chiasmenhäufigkeit, wohl aber besitzen sie eine mehr oder weniger kräftige mutagene Wirkung.
4. Temperatur- und Schockversuche ergaben Veränderungen in der Anzahl der gebildeten Chiasmen, wobei die Länge der Intervalle und die Anzahl der applizierten Schocks eine Rolle spielen.

5. Für fast alle mutagenen Agenzien, anorganische wie organische Verbindungen und auch für die Röntgenstrahlen konnte eine auffallende Erhöhung der Streuung in der Chiasmenformation nachgewiesen werden, wobei die einzelnen Individuen eines Versuchs ein unterschiedliches Verhalten zeigten.

6. Paralleluntersuchung von Chiasmafrequenz und Mutationsrate an den reziproken Bastarden erbrachte keine gleichsinnige Veränderung der beiden Phänomene. Auch aus der Zusammenfassung aller 118 Versuche ergab sich keine Korrelation zwischen Chiasmenbildung und Mutationsgeschehen.

7. Es wird darauf hingewiesen, daß die Einwirkung von Chemikalien auf das komplizierte Stoffwechselgefüge einer lebenden Pflanze komplexe und vielfältige Reaktionen erzeugen kann, von denen sekundäre Einflüsse auf Chiasmenbildung und Mutationsgeschehen erfolgen können.

#### Literatur.

- ALEŠIN, S. N., u. M. T. JASTREBOV: Ladungsänderungen der Wurzel des Weizens in Gegenwart von Aluminium und Phosphationen. Dokl. Akad. Nauk. SSSR., N. S. 70 (1950). Zit. Ber. wiss. Biol. 71, H. 1, 25. — D'AMATO, F.: The quantitative study of mitotic poisons by the *Allium Cepa* Test: Data and Problems. Protoplasma 39, 423—433 (1950). — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. J. Genet. 46, 180—267 (1945). — DARLINGTON, G. D., and P. C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. Heredity 1, 187—221 (1947). — ERNST, H.: Meiosis and crossing over. Zytologische und genetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus* L. Z. Bot. 33, 241—294 (1938). — HARTE, C.: Meiosis and crossing over. Weitere Beiträge zur Zytogenetik von *Oenothera*. Z. Bot. 38, 65—137 (1942). — HASELWARTER, A.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. V. Z. Bot. 31, 273—328 (1937). — HESSE, G., J. PIWITZ u. O. DIETZEL: Über die Wirkung von Nitriten auf die Mitosen der Zellen des Ehrlich-Ascitescarcinoms. Z. exper. Med. 115, 350—359 (1950). — HÜTTIG, W.: Über physikalische und chemische Beeinflussung des Zeitpunktes der Chromosomenreduktion bei Brandpilzen. Z. Bot. 26, 1—26 (1933). — KISCH, R.: Die Bedeutung der Wasserversorgung für den Ablauf der Meiosis. VI. Physiologie der Meiosis. Jb. wiss. Bot. 85, 450—484 (1937). — KOLLER, P. C.: Nucleic acid control in the X-Chromosomes of the hamster. Proc. Roy. Soc., Ser. B 133, 313 (1946a). — KOLLER, P. C., and THELMA TOWNSON: The cytological basis of suppression of crossing over. Proc. Roy. Soc. Edinburgh 53 (II), 130—143 (1932). — KOSTOFF, D.: Changes in the chiasma frequency in *Petunia* induced by virus disease. Current Sci. 6, 555—556 (1938). — LEVAN, A.: Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. Nature 156, 715 (1945). — LEVAN, A.: The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the *Allium* test. Hereditas, Suppl. 1949, 325—337. — MARQUARDT, H.: Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Chiasmenfrequenz in der Meiosis von *Vicia faba*. Chromosoma 4, 232—238 (1951). — Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch tiefe Temperaturen. Z. Vererbungslehre 84, 169—181 (1952). — MATHER, K.: Statistical Analysis in Biology. London 1949. — OEHLKERS, F.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. I. Z. Bot. 29, 1—53 (1935). — Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. III. Z. Bot. 30, 253—276 (1936). — Neue Versuche über zytologisch-genetische Probleme. Biol. Zbl. 57, 126—149 (1937). — Die Aus-

lösung von Chromosomermutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. Vererbungslehre 81, 313—341 (1943). — Chromosome breaks influenced by chemicals. Heredity (im Druck). — OEHLKERS, F., u. G. LINNERT: Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Vererbungslehre 83, 136—156 (1949). — Weitere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. Z. Vererbungslehre 83, 429—438 (1951). — POLITZER, O.: Veränderungen der crossover-Häufigkeit durch Einwirkung von Temperatur und Alter. *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre 78, 129—147 (1940). — STRAUB, J.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. II. Z. Bot. 30, 1—57 (1936). — Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. VII. Z. Bot. 32, 225—268 (1937). — WARBURG, O.: Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin: Springer 1928. — WHITE, M. J. D.: The influence of temperature on chiasma frequency. — J. Genet. 29, 203—213 (1934). — WIEBALCK, UTE: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. XI. Z. Bot. 36, 162—212 (1940). — ZÜRN, K.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. IV. Z. Bot. 30, 577—603 (1937). — Die Bedeutung der Plastiden für den Ablauf der Meiosis. Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. IX. Jb. wiss. Bot. 85, 706—731 (1937). — Physiologie der Meiosis. X. Neue Beiträge zur Kenntnis des Einflusses der Plastiden auf den Ablauf der Meiosis. Z. Bot. 34, 273—310 (1939).

Dr. GERTRUD LINNERT, Freiburg i. Br.,  
Botanisches Institut, Schänzlestr. 9—11,

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Göttingen.

ÜBER KERNWACHSTUM, ENDOMITOTEN UND  
FUNKTIONSZYKLEN IN DEN TRICHOGENEN ZELLEN  
VON CORIXA PUNCTATA ILLIG.

Von

CHRISTINE LIPP.

Mit 25 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. November 1952.)

Inhalt.

	Seite
Einleitung . . . . .	454
Material und Methoden . . . . .	455
Die Entwicklungsphasen der Epidermis in einem Häutungsintervall . . . . .	457
Die Borstenapparate . . . . .	458
Die Ribonukleinsäure im Funktionszyklus der Zelle . . . . .	462
Der Formwechsel und das Teilungsverhalten der Chromosomen . . . . .	464
Die Änderungen der Kerngröße und die Zellfunktion . . . . .	470
Das Kernwachstum und sein Verhältnis zur Endomitose und zur Polyploidie . . . . .	473
Besprechung der Ergebnisse . . . . .	481
Zusammenfassung . . . . .	484

Einleitung.

JACOBJ (1925) beobachtete in einigen Organen von Wirbeltieren mehrgipflige Variationskurven der Kerngrößen; dabei verhielten sich die Werte der Maxima wie 1:2:4. JACOBJ schloß daraus auf ein *rhythmisches Kernwachstum*, das er im Sinne von HEIDENHAINs Protomerentheorie deutete. WERMEL und SCHERSCHULSKAJA (1934) fanden im Fettgewebe von Seidenraupen einen Vergrößerungsfaktor von 1,5. Danach konnte die HEIDENHAINsche Protomerentheorie nicht aufrechterhalten werden, da diese Theorie eine genaue Volumenverdoppelung von Kern und Plasma fordert. WERMEL führte verschiedene Kerngrößen auf verschiedene Polyploidiestufen zurück, wie sie schon FROLOWA (1929) bei *Drosophila* gefunden hatte. Schließlich konnte GEITLER (1938, 1939) den Beweis erbringen, daß das rhythmische Kernwachstum mit einer Chromosomenteilung ohne Kernteilung, einer Endomitose, verknüpft ist.

HINTZSCHE und seine Schüler beschäftigten sich mit vorübergehenden *Kernvergrößerungen bei starker Zelltätigkeit*. So fand z. B. TANNER (1939) im Rattendarm während des Tätigkeitszustandes größere Kerne als im Hungerzustand. Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang eine Arbeit von STICH (1951b), in der er an *Acetabularia* durch Experimente in Verbindung mit chemischen Untersuchungen Beziehungen zwischen Kerngröße und Eiweißsynthese nachgewiesen hat.



Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Beziehungen zwischen Kerngröße, Chromosomenzahl und Zellaktivität, sowie mit endomitotischen Vorgängen. Für solche Untersuchungen sind die trichogenen Zellen der Insekten besonders geeignet. Schuppen und Borsten sind quantitativ meßbare Abscheidungen trichogener Zellen; mit ihnen ist ein Maß für die Zellaktivität gegeben. In dem genauer untersuchten Schuppenbestand der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. treten 4 Größentypen von Schuppen und 2 Längentypen von Schuppenbälgen auf, und die Volumina der zugehörigen Bildungszellkerne bilden eine rhythmische Vergrößerungsreihe, der eine Reihe von 5 Polyploidiestufen entspricht (HENKE und MERTZ 1941, HENKE 1945, HENKE und POHLEY 1952).

Als Objekt zu den folgenden Untersuchungen wurde die Wasserrwanze *Corixa punctata* ILLIG. (= *Corixa geoffroyi* LEACH) gewählt, weil sie besonders günstige Präparationsmöglichkeiten bietet. Außerdem sind bei Wanzen die einzelnen Phasen der Endomitose besonders gut zu verfolgen.

Die Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. K. HENKE ausgeführt. Ich danke ihm für mannigfache Unterstützung und Förderung.

#### Material und Methoden.

**Das Untersuchungsobjekt.** Die Wanzen wurden in Dransfeld (314 m ü. M.) bei Göttingen gefangen. Es gelang auch, einige Tiere vom Ei bis zur Imago im Aquarium aufzuziehen. Im Freien treten die ersten Larven im Mai auf. Die Eier sind schon im Januar befruchtet; Weibchen, die um diese Zeit in ein Aquarium (20° C) gebracht werden, beginnen sofort mit der Eiablage. Vier Wochen später schlüpfen die ersten Larven. Vor dem ersten Frost ins Aquarium genommene Weibchen zeigen keine Eientwicklung. Auch Weibchen, die mit Männchen zusammen im Aquarium überwintern, legen keine Eier. Vielleicht ist zur Eientwicklung ein Kälteschock nötig. Es ist auch möglich, daß im Aquarium die nötigen Bedingungen zur Kopulation fehlen.

Im Aquarium dauert jedes Larvenstadium 8, im Freien dagegen 14 Tage. In einem besonders warmen Sommer betrugen die Häutungsintervalle im Freiland nur 10 Tage. In diesem Sommer waren die Zellkerne relativ groß; sie wurden daher nicht zu Messungen verwendet.

*Corixa* macht 5 Häutungen durch. Die Larvenlängen betragen 2,0; 3,0; 4,5; 6,2 und 8,6 mm. Männliche und weibliche Larven sind äußerlich nicht voneinander zu unterscheiden.

Es wurden die *Borsten* untersucht, die am Rande des sehr flachen Abdomens angeordnet sind (Abb. 1). Die 3 letzten Abdominalsegmente (6—8) der männlichen Imago sind asymmetrisch gebaut. In der Beborstung dieser Segmente treten auch bei Larven und mitunter bei Weibchen Störungen auf. Daher wurden nur die Borsten des 5. Abdominalsegmentes untersucht. Wie der Querschnitt zeigt (Abb. 2), werden die trichogenen Zellen nur von der Epidermis der Tergite und der Sternite bedeckt.

**Präparation.** Die Tiere sind im 1. und 2. Larvenstadium noch so schwach pigmentiert und durchsichtig, daß es genügt, nach Abtrennen des Abdomens und Heraus schneiden des Darmes total zu färben und einzubetten. Im 3.—5. Larvenstadium und bei den Imagines ist die Cuticula dicker und stärker pigmentiert. Deshalb wurde das abgetrennte Abdomen sagittal durchgeschnitten und der Darm

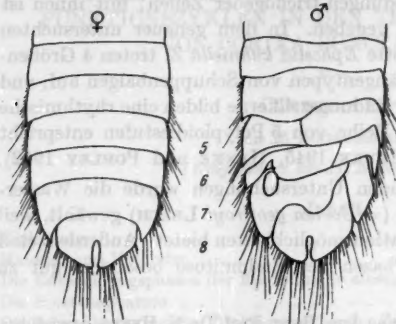


Abb. 1. Abdomen einer weiblichen und einer männlichen Imago von *Corixa punctata*, Dorsalansicht.

22 min in n-HCl bei 60° C hydrolysiert. Zur Gegenfärbung wurden Licht-

Zur Färbung mit Karminessigsäure wurde ebenfalls mit Bouin-Allen fixiert. Bei der hier gewöhnlich verwendeten Alkohol-Eisessigfixierung werden die Kerne leicht gequetscht; außerdem sind nach Bouin-Allen-Fixierung Kernmembran und

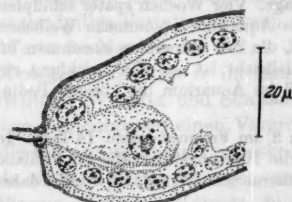


Abb. 2. Querschnitt durch den Rand eines Abdomens, 3. Larvenstadium. Karminessigsäure.

Chromosomen dunkler gefärbt, was die Benutzung von Grünfiltern überflüssig macht. Zur Untersuchung der Endomitosen anderer Gewebe wurde in Alkohol-Eisessig (3:1) fixiert; dann wurden in üblicher Weise Karminessigsäure-Quetschpräparate hergestellt.

Zur Kontrolle wurden Schnittpreparate gemacht. Dazu wurde vor dem Schneiden total in Karminessigsäure gefärbt.

Zum Nachweis von Ribonukleinsäure wurde in Alkohol-Eisessig fixiert und mit Toluidinblau oder Methylgrün-Pyronin gefärbt. Methylviolett wurde aus dem Methyl-

grün-Merck mit Chloroform ausgeschüttelt. Zur Kontrolle wurden die Präparate vor der Färbung 10 min lang mit 0,3 mol Trichloressigsäure bei 90° C behandelt, wodurch sämtliche Nukleinsäuren entfernt werden (SCHNEIDER 1945). Um die Ribonukleinsäure allein zu extrahieren, wurden die Präparate 3—4 min bei 60° C mit n-HCl (STICH 1951) oder 30 min mit 1%iger NaOH (vgl. SCHNEIDER 1945) behandelt.

Die Borsten- und Kernmessungen wurden nur an nach BOVIN-ALLEN fixiertem Material ausgeführt. Es wurden mit dem Zeichenapparat nach ABBE nach dem Objektmikrometer verschiedene Maßstäbe mit den entsprechenden Vergrößerungen hergestellt. Diese wurden unter Benutzung des Zeichenapparates mit dem zu

entfernt; von jeder Abdomenhälfte wurden dann Rücken- und Bauchdecke mit 2 Pinzetten voneinander getrennt. Die beiden Körperdecken trennen sich leicht in der Seitenlinie neben den Borsten. Die Borsten bleiben mit ihren Bildungszellen meist an der Rückendecke haften; die Zellen liegen nun frei. Die Cuticula wurde vor dem Färben mit Wasserstoffsuperoxyd gebleicht.

**Färbung.** Zur Chromosomenfärbung nach FEULGEN wurde in Bouin-Allen nach BAUER 6 Std bei Zimmertemperatur fixiert. Die Präparate wurden

messenden Objekt zur Deckung gebracht; die Werte waren dann direkt in Mikron ablesbar. Auf diese Weise erhält man eine Meßgenauigkeit von  $\pm 0,1 \mu$ .

Die Kerne erschienen in der Flächenansicht elliptisch. Es wurden jeweils der größte und der kleinste Durchmesser gemessen. Der kleinste Durchmesser ist dem senkrecht zur Flächenansicht stehenden etwa gleich, wie an Schnittpreparaten nachgeprüft wurde. Die Kernvolumina wurden daher als Rotationsellipsoide nach  $V = 4/3\pi ab^2$  berechnet. Da die Unterschiede der beiden Achsen  $a$  und  $b$  gering sind, konnte nach dieser vereinfachten Formel gerechnet werden. Die Volumina der Borsten konnten nach der Kegelformel  $V = 1/3\pi r^2 h$  berechnet werden.

### Die Entwicklungsphasen der Epidermis in einem Häutungsintervall.

Physiologisch zerfällt jedes Larvenstadium in 6 Altersklassen, wie sie in Tabelle 1 angegeben sind.

Die in der Tabelle 1 angegebenen Prozentwerte für die Dauer der einzelnen Altersklassen gelten für das 5. Abdominalsegment. Bei den weiter hinten gelegenen Segmenten dauern Klasse I kürzere, Klasse V und VI längere Zeit; bei den weiter vorn gelegenen ist das umgekehrte der Fall. Die Borstengröße nimmt im ganzen, abgesehen von dem Borstenmuster der einzelnen Segmente, von hinten nach vorne ab. Dementsprechend ist die Zeit der Cuticulaausscheidung (Altersklasse V und VI) in den hinteren Abdominalsegmenten verlängert.

Das Häutungshormon wirkt nicht allein auf die Epidermis, sondern auf sämtliche Organe. Das gleiche hat RISLER (1950) bei *Ptychopoda* festgestellt. Ausgenommen sind imaginale Organe, wie z. B. die Gonaden.

Die einzelnen Phasen der Endomitose verlaufen in allen Geweben etwa gleichzeitig, ihre Prophasen fallen mit den Prophasen der Epidermismitosen zusammen.

Die Einzelheiten der Tabelle werden in den folgenden Abschnitten besprochen.

Tabelle 1. Physiologische Altersklassen eines Häutungsintervalls.

Altersklasse	Dauer in %	Cuticula	Epidermiskerne		Endomitose
I	16	vollständig	Interphasen		Interphasen
II	26	beginnende Auflösung und Abhebung	Prophasen und einzelne Mitosen		Prophasen
III	13		größte Häufigkeit der Mitosen	degenerierende Kerne	Metaphasen
IV	18	Auswachsen der großen Borsten			Anaphasen
V	16	alle Borsten ausgewachsen	letzte Mitosen		Telophasen
VI	11	Differenzierung der Cuticula, vollständige Chitinisierung	Interphasen		Interphasen

### Die Borstenapparate.

STROSSBERG (1937, 1938) hat die Entwicklung der *Schuppenapparate* des Flügels von *Ephesia kühniella* Z. beschrieben. Durch die Teilung einer Schuppenstammzelle I. Ordnung, bei der die Spindel senkrecht zur Flügeloberfläche steht, entsteht die Schuppenstammzelle II. Ordnung und ein Kern, der in die Tiefe wandert und

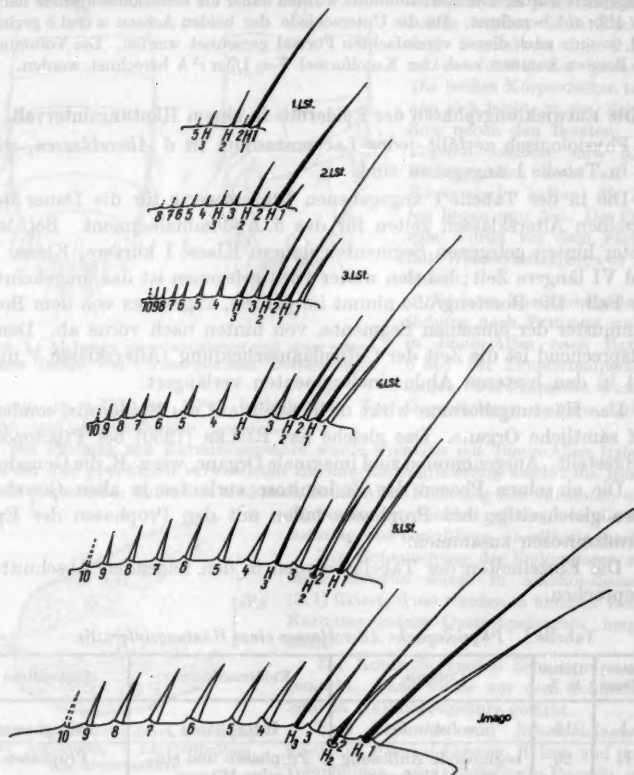


Abb. 3. Borstenmuster des 5. Abdominalsegmentes aller Larvenstadien und der weiblichen Imago. Haare (1—3) schwarz, Borsten (1—10) umrandet, gestrichelt die manchmal vorzeitig gebildeten Borsten und die häufig fehlende Borste 10.

dort degeneriert. Aus der Schuppenstammzelle II. Ordnung entsteht durch eine 2. differentielle Teilung, bei der die Spindel schräg zur Oberfläche des Flügelepithels liegt, die an der Oberfläche bleibende Balgbildungszelle und die daruntergelegene Schuppenbildungszelle. Neuere Untersuchungen (HENKE und RÖNSCH 1951, KRUMHŠ 1952) haben gezeigt, daß auch die aus 3 Zellen bestehenden *Borstenapparate* durch 2 solche aufeinanderfolgende differentielle Teilungsschritte entstehen. Dabei entspricht die Sinneszelle innervierter Borsten der degenerierenden

Zelle, die aus der 1. Teilung hervorgeht (HENKE 1951). Der Schuppenbildungszelle der Schmetterlinge entspricht die Borstenbildungszelle (trichogene Zelle), der Balgbildungszelle die Ringbildungszelle (tormogene Zelle).

Im 5. Abdominalsegment von *Corixa* kommen neben Borsten im engeren Sinne auch Haare vor (Abb. 3). Beide Gruppen von Trichen differieren untereinander stark; aber auch die einzelnen Haare und Borsten sind durch ihre verschiedene Länge gut gekennzeichnet. Die Haare sind sehr viel schlanker als die Borsten. Ihre relativen Längen (bezogen auf den Durchmesser) betragen im letzten Larvenstadium 64, 51 und 32. Die entsprechenden Werte für die Borsten beginnen hinten mit dem Wert 25 (Abb. 4). Sie nehmen gleichfalls nach vorn zu ab, und zwar besonders bei den im Bereich der Haare stehenden Borsten 1—3 (vgl. Abb. 4), bei den anschließenden Borsten 4—10 nur noch schwach. Von diesem Gesichtspunkt aus läßt sich das Borstenmuster in zwei Teilmuster zerlegen, deren Trennung in Abb. 4 durch einen Knick der Kurve bei Borste 4, der ersten nicht mehr neben oder hinter einem Haar stehenden Borste, zum Ausdruck kommt.

Die Entwicklung der Haare und Borsten geht in jedem Larvenstadium von denselben trichogenen Zellen aus (vgl. KRUMINŠ 1952). Zu den im ersten Larvenstadium entwickelten Borsten treten in den späteren noch neue hinzu (Abb. 3), deren Bildungszellen in den ersten Stadien bereits vorhanden sind (Abb. 5). Im allgemeinen finden die differentiellen Teilungen der Stammzelle in die trichogene, die tormogene und die Sinneszelle jedenfalls schon im Embryo statt. Es ist aber möglich, daß die Stammzellen der erst im 3. Larvenstadium auftretenden Borsten 9 und 10 sich erst im 1. Larvenstadium teilen. Dies ist im Totalpräparat schwer zu entscheiden. In seltenen Fällen werden neue Borsten auch schon vorzeitig gebildet (in Abb. 3 gestrichelt).

Das Borstenmuster ist immer das gleiche bis auf wenige Fälle, in denen die Borste 2 mit dem Haar 2 oder die Borste 3 mit dem Haar 3 platzmäßig vertauscht ist. Will man nicht die bei der strengen Regelmäßigkeit des Musters wenig wahrscheinliche Annahme machen, daß die bereits determinierten Zellen eines Paares durch Zellbewegungen

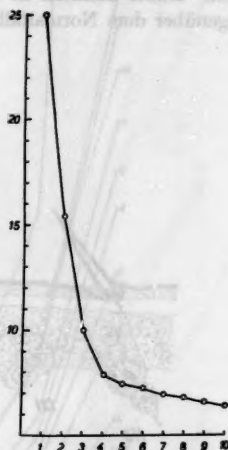


Abb. 4. Verhältnis Länge : Durchmesser der Borsten des 5. Abdominalsegmentes im 5. Larvenstadium. Ordinate: Mittelwerte von  $h/2r$ , Abszisse: Nummer der Borste = Ort im Segment, von hinten nach vorn gezählt.

ihre Plätze vertauschen können, so folgt hieraus, daß die Bildungs- oder Stammzellen nicht nach ihrem Ort in der Reihe zu Borsten- oder Haarbildungszellen determiniert werden. Vielleicht entspringen die Paare aus 2 örtlich vertauschbaren Trichen je einer gemeinsamen Stammzelle, aus der durch differentielle Teilung je eine Stammzelle für ein Haar und eine (wie bemerkt besonders schlanke) Borste hervorgeht. Dabei könnten in einigen Fällen determinierende Faktoren in gegenüber dem Normalfall umgekehrter Richtung verteilt werden.

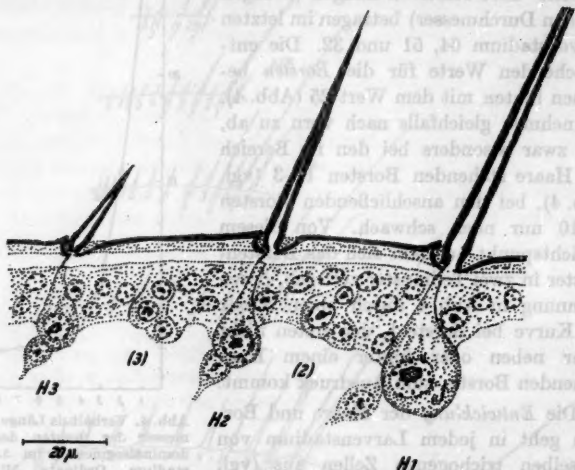


Abb. 5. Teil des 5. Abdominalsegmentes im 1. Larvenstadium. Zwischen den Haaren 1, 2 und 3 die Zellverbände der Borsten 2 und 3. Karmineisigsäure.

Die Trichen werden in jedem Larvenstadium länger und dicker, jedoch unterscheiden sich Haare und Borsten in ihrem Wachstum. Der Wachstumsfaktor beträgt für das Volumen in jedem Larvenstadium für Haare  $1,84 \pm 0,1$ , für Borsten  $3,72 \pm 0,2$  (Abb. 6). Die unterschiedliche Endgröße der einzelnen Borsten und der einzelnen Haare entsteht jedenfalls im wesentlichen nicht durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren, sondern dadurch, daß die hinteren Trichen schon am Ende der Embryonalentwicklung größer sind und zum Teil auch früher auftreten als die vorderen. Für Haare ist vor allem charakteristisch, daß sich ihr Längen-Durchmesser Verhältnis von Häutung zu Häutung stark zugunsten der Länge ändert, während dieses Verhältnis bei den Borsten etwa konstant bleibt. Ausgenommen hiervon ist die Borste 1, deren Verhältniswert sich im Laufe der Entwicklung fast verdreifacht. Sie bildet damit noch ausgeprägter als die gleichfalls besonders schlanken



Borsten 2 und 3 eine Übergangsform zwischen Haaren und Borsten. Diese Sonderstellung gegenüber den anderen Borsten des Segments kommt auch im Verhalten ihres Zellkerns zum Ausdruck.

Alle Borsten sind innerviert. Die Sinneszellen junger Borstenzellverbände haben noch keine Verbindung zum Zentralnervensystem. Erst

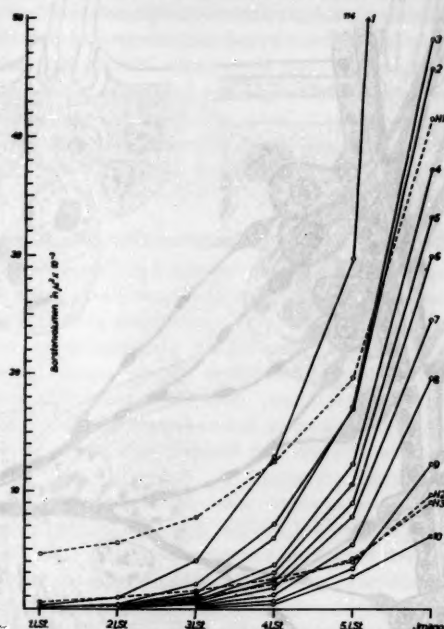


Abb. 6. Wachstumskurven der Haare (gestrichelt) und Borsten (ausgezogen) des 5. Abdominalsegmentes. Jeder Punkt wurde aus 100 Durchmesser- und 50—70 Längenmessungen gewonnen.

mit Auftreten der Borste ist der Anschluß hergestellt. Danach wandert die Sinneszelle oft weit aus der Epidermis heraus (Abb. 7). Anscheinend ist jede Nervenfasern bis zum Ganglion von einem eigenen Neurilemm umgeben.

Der Kern der *tormogenen Zelle* kann innerhalb der Zelle jede beliebige Lage einnehmen, liegt aber zur Zeit der Ringbildung immer in dem spitzen Winkel, den die auswachsende Borste mit der Epidermis bildet. An der dem Kern gegenüberliegenden Seite der Zelle wird der Ring stärker ausgebildet, wodurch die Borste in ihrer Schräglage gehalten wird (vgl. Abb. 7). Am Hinterende des Abdomens

stehen die Borsten fast senkrecht zur Epidermis; dementsprechend liegt hier der Kern der Ringbildungszelle etwa in der Mitte unter der Borste (vgl. Abb. 8).

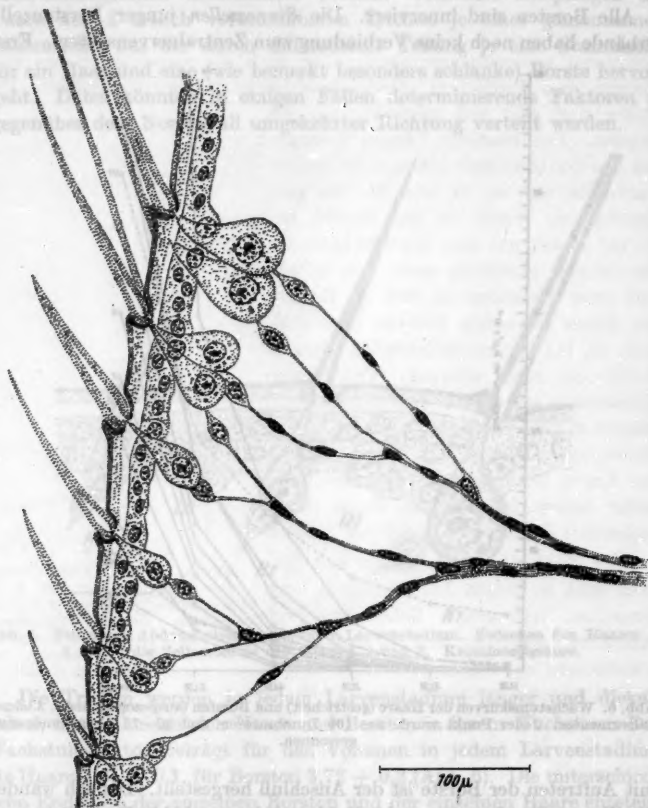


Abb. 7. 5. Abdominalsegment im 4. Larvenstadium, Innervierung der Borsten. Leicht mazeriert, Karminessigsäure.

#### Die Ribonukleinsäure im Funktionszyklus der Zelle.

STOSSBERG (1937, 1938) fand im Plasma der Schuppenbildungszellen von *Ephestia* Substanzen, die verschiedene Plasmafarbstoffe annahmen. Das Plasma der trichogenen Zellen von *Corixa* enthält ähnliche Einschlüsse, deren Gehalt an Ribonukleinsäure nachgewiesen werden konnte.

Zu Beginn jedes Larvenstadiums liegen im Plasma der ruhenden Zelle, je nach deren Größe, 1—3 Schollen, die Ribonukleinsäure enthalten (Abb. 8). Zur Zeit der Endoprophase (Alteraklasse II = AKI. II)

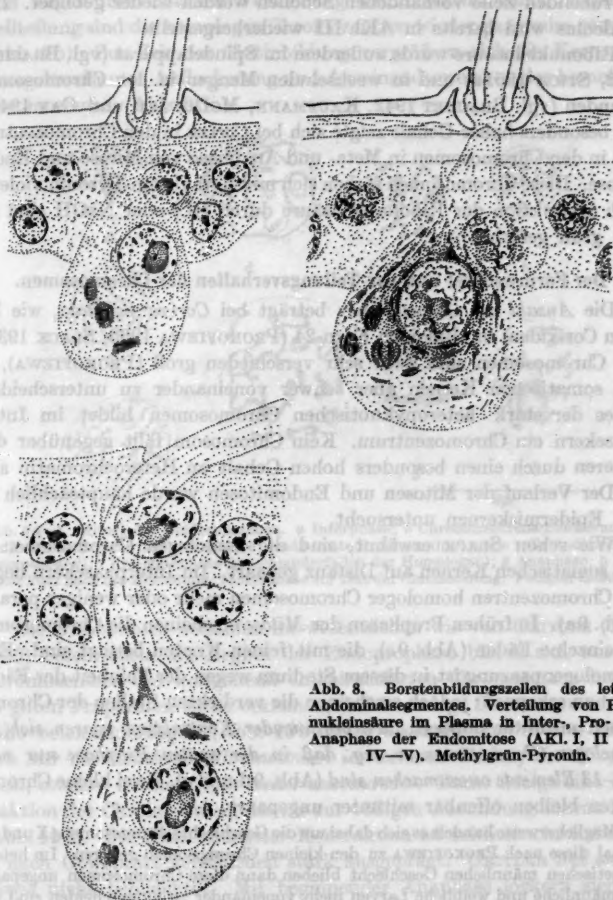


Abb. 8. Borstenbildungszellen des letzten Abdominalsegmentes. Verteilung von Ribonukleinsäure im Plasma in Inter-, Pro- und Anaphase der Endomitose (AKI. I, II und IV—V). Methylgrün-Pyronin.

beginnt der Nukleolus in einzelne Stücke zu zerfallen. Gleichzeitig bilden sich im Plasma tangential an der Kernmembran Stränge von Ribonukleinsäure. Die schon im Plasma der ruhenden Zelle vorhandenen Schollen lösen sich zwiebelschalenartig in ähnliche Stränge auf, die dann

zusammen mit den anderen in Richtung der auswachsenden Borste wandern. Mit Beginn der Cuticulaausscheidung (AKI. IV) schwindet allmählich der Gehalt an Ribonukleinsäure, lediglich die auch im Plasma der ruhenden Zelle vorhandenen Schollen werden wieder gebildet. Der Nukleolus wird bereits in AKI. III wiederhergestellt.

Ribonukleinsäure wurde außerdem im Spindelapparat (vgl. BRACHET 1942, STICH 1951a) und in wechselnden Mengen in den Chromosomen gefunden (vgl. BRACHET 1942, KAUFMANN, McDONALD und GAY 1948). Ein besonders hoher Gehalt zeigte sich bei *Corixa* in den Chromozentren und in den Chromosomen in Meta- und Anaphase von Mitose und Endomitose. Diese Chromosomen färben sich mit Methylgrün-Pyronin violett: nach Extraktion der Ribonukleinsäure durch HCl oder NaOH sind sie rein grün gefärbt.

#### Der Formwechsel und das Teilungsverhalten der Chromosomen.

Die Anzahl der Chromosomen beträgt bei *Corixa punctata*, wie bei allen Corixiden, im diploiden Kern 24 (PROKOFIEWA 1933, SLACK 1938). Die Chromosomen sind zwar sehr verschieden groß (PROKOFIEWA), in den somatischen Kernen aber schwer voneinander zu unterscheiden. Jedes der stark heteropyknotischen Chromosomen bildet im Interphasekern ein Chromozentrum. Kein Chromosom fällt gegenüber den anderen durch einen besonders hohen Gehalt an Heterochromatin auf.

Der Verlauf der Mitosen und Endomitosen wurde hauptsächlich an den Epidermiskernen untersucht.

Wie schon SLACK erwähnt, sind die homologen Chromosomen in den somatischen Kernen auf Distanz gepaart. Im Interphasekern liegen die Chromozentren homologer Chromosomen mehr oder weniger parallel (Abb. 9a). In frühen Prophasen der Mitose erscheinen die Chromosomen als einzelne Fäden (Abb. 9c), die mit feinen Knoten besetzt sind. Eine Homologenpaarung ist in diesem Stadium wegen der Feinheit der Fäden nicht zu erkennen; jedoch erscheinen die verdickten Stellen der Chromosomen mitunter doppelt. Mit beginnender Kontraktion paaren sich die homologen Chromosomen so eng, daß in der späten Prophase nur noch 12—13 Elemente auszumachen sind (Abb. 9d und e). Zwei kleine Chromosomen bleiben offenbar mitunter ungepaart.

Möglicherweise handelt es sich dabei um die Geschlechtschromosomen (X und Y), zumal diese nach PROKOFIEWA zu den kleinen Chromosomen gehören. Im heterogametischen männlichen Geschlecht blieben dann diese Chromosomen ungepaart. Da männliche und weibliche Larven nicht voneinander zu unterscheiden sind und in den Imagines keine somatischen Mitosen mehr stattfinden, kann dies nicht nachgeprüft werden.

In der späten Prophase werden die Chromosomen plötzlich dicker, ohne sich weiter kontrahiert zu haben (Abb. 9e); wahrscheinlich findet hier die Spaltung der Chromosomen statt. Die Paarlinge scheinen sich

erst in der frühen Metaphase zu trennen (Abb. 9f). Ihr weiteres Verhalten läßt sich nicht beurteilen, weil die stark kontrahierten Chromosomen der Meta- und Anaphase nicht voneinander zu unterscheiden und wegen ihrer starken Verklebung kaum zählbar sind. Nach der Zellteilung sind die homologen Chromozentren wieder paarweise geordnet (Abb. 9h). Zur Zeit der Chitinbildung vergrößern sich die Kerne vorübergehend unter Auflockerung und Auseinanderweichen der homologen Chromosomen (Abb. 9i).

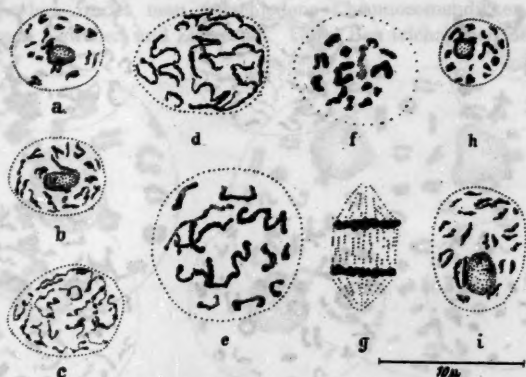


Abb. 9a—i. Mitose der Epidermiszellen. a Interphase; b Chromozentrenauflöckerung vor der Prophase; c sehr frühe; d spätere; e sehr späte Prophase (in d und e vollständige Homologenpaarung); f Pro-Metaphase (Auseinanderfallen der Homologen); g Anaphase; h Interphase kurz nach der Zellteilung; i Interphase zur Zeit der Chitinbildung. Feulgen-Lichtgrün.

Die *Endomitosen* verlaufen im wesentlichen wie von GEITLER (1938, 1939) beschrieben: Zu Beginn der Endoprophase bilden sich aus den Chromozentren die weitgehend entspiralisierte Chromosomen heraus. In guten Präparaten ist zu erkennen, daß homologe Chromosomen stets nahe beieinanderliegen (Abb. 10b). Im Gegensatz zur Mitose paaren sich hier die homologen Chromosomen im weiteren Verlauf der Prophase nicht, sondern weichen sogar weiter auseinander. Dann erfolgt eine Kontraktion der Chromosomen, die bis zur völligen Abrundung führen kann (Abb. 10d). Die Phase stärkster Kontraktion ist zeitlich sehr kurz und je nach Gewebeart verschieden stark ausgeprägt. GEITLER hat sie bei *Gerris* nicht beobachtet. Mit beginnender Anaphase lockern sich die Tochterchromosomen wieder auf, rücken nur wenig auseinander und bleiben in der Endotelophase nebeneinander liegen (Abb. 10e und f). Die Telophase ist von der Anaphase schwer zu unterscheiden. GEITLER hat als Endotelophase das Kernstadium bezeichnet, in dem der Nukleolus neu gebildet wird. Dagegen bestehen jedoch Bedenken, da die

Auflösung und Neubildung des Nukleolus in Beziehung zur Zelltätigkeit steht, die mit der Endomitose nicht immer in entsprechender Weise koordiniert ist. Wie schon erwähnt, tritt der Nukleolus in den trichogenen Zellen schon in der Endometaphase wieder auf. Als Telophase soll daher im folgenden das Stadium stärkster Chromosomenauflockerung kurz vor der Chromozentrenbildung gelten.

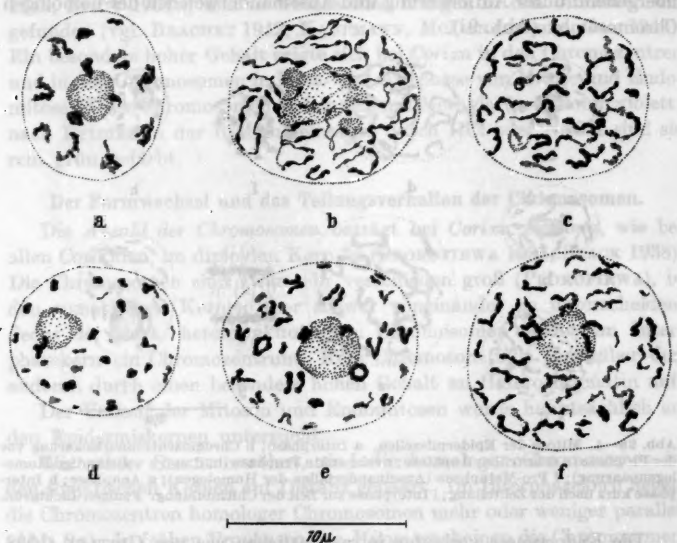


Abb. 10a—f. Endomitose einer Borstenbildungszelle  $2n-4n$ . a Interphase; b Prophase (die homologen Chromosomen liegen noch nahe beieinander); c späte Prophase; d Metaphase; e Anaphase; f Telophase. Feulgen-Lichtgrün.

Bei der Endomitose polyploider Kerne verhalten sich die Schwesterchromosomen zueinander wie die Homologen in diploiden Kernen. Bei polyploiden Kernen sind die einzelnen Phasen der Endomitosen weniger klar voneinander unterschieden als in den ersten Endomitosen.

In Kernen niedriger Polyploidiestufe, die eine größere Anzahl von Endomitosen vor sich haben, erscheinen die Chromosomen dicker als in ihren hochpolyploiden Abkömmlingen. An den Kernen der Malpighigefäße wird dies besonders deutlich (Abb. 11). Unter den diploiden Kernen der trichogenen Zellen des ersten Larvenstadiums (vgl. Tabelle 2, S. 473) enthält der Kern der Borste 1, der als einziger eine Polyploidiestufe von  $32n$  erreicht, dickere Chromosomen als die übrigen Kerne; am dünnsten sind die Chromosomen in den Kernen, die nur oktaploid



werden. Im letzten Larvenstadium sind die Chromosomen aller Borstenbildungszellkerne etwa gleich dick. Die Unterschiede sind nicht meßbar und fallen erst bei guter Kenntnis des Objekts auf. Dagegen sind die Chromosomen der mitotischen Epidermiskerne vom ersten bis zum letzten Larvenstadium gleich dick. Die Vermutung liegt nahe, daß die Chromosomen in den endomitotischen Kernen schon zu Beginn der Entwicklung in die Zahl von Längselementen unterteilt sind, die der endgültigen Zahl der Chromosomen entspricht.

Außerdem findet man verschiedene Chromosomendicken in verschiedenen Geweben und Zellsorten. Unter den trichogenen Zellen sind

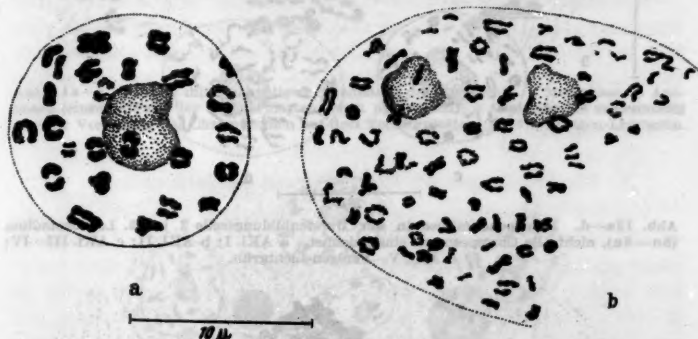


Abb. 11a u. b. Frühe Endoanaphase im Malpighi-Gefäß. a Endomitose  $2n-4n$  (2. Larvenstadium); b Endomitose  $8n-16n$  (4. Larvenstadium). Karminessigsäure-Quetschpräparat.

die Chromosomen in den Haarbildungszellen sehr viel dünner als in den Borstenbildungszellen.

In verschiedenen, jeweils bestimmten, Larvenstadien machen einzelne Kerne trichogener Zellen keine Endomitose durch (s. Tabelle 2). Die Chromosomen dieser Kerne zeigen dann Veränderungen, wie sie einer Endomitose entsprechen. Sie sollen als *Pseudoendomitose* bezeichnet werden. Auch hier verhalten sich die Schwesterchromosomen polyploider Kerne ebenso zueinander wie die homologen Chromosomen diploider Kerne. In AKI. II erscheinen aufgelockerte Chromosomen (Abb. 12b). Bei der folgenden Kontraktion rücken die homologen Chromosomen diploider Kerne bzw. die aus der letzten Endomitose hervorgegangenen Tochterchromosomen polyploider Kerne enger zusammen, doch kommt es auch hier nicht zu so enger Paarung wie in der Mitose. In AKI. IV—V weichen sie wieder auseinander (Abb. 12c), lockern sich auf (Abb. 12d) und bilden in AKI. VI wieder Chromozentren. Im Unterschied zu einer Endomitose zeigen die Chromosomen schwächere Kontraktionen und

undeutlichere Paarungen. Außerdem entspiralisieren sie sich nach der Kontraktion schneller. Ob eine Endomitose vorliegt, läßt sich aber im Einzelfall nur durch Zählung der Chromosomen mit Sicherheit entscheiden.

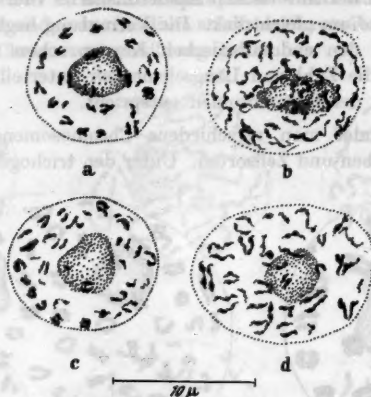


Abb. 12a—d. Pseudoendomitose in der Borstenbildungszelle 2 im 3. Larvenstadium (8n—8n), nicht alle Chromosomen eingezeichnet. a AKI. I; b AKI. II; c AKI. III—IV; d AKI. V. Feulgen-Lichtgrün.

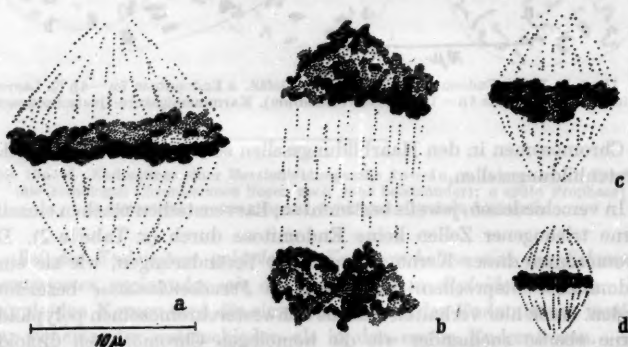


Abb. 13a—d. Mitosen im Fettgewebe. a und b Meta- und Anaphase eines oktaploiden, c Metaphase eines tetraploiden Fettgewebekernes. Zum Vergleich die Metaphase eines diploiden Epidermiskernes (d). Feulgen-Lichtgrün.

In einem Schema (Abb. 25) ist das Verhalten der Chromosomen in Mitose, Endomitose und Pseudoendomitose noch einmal vergleichend dargestellt.

Mitotische Teilungen wurden außer in der Epidermis auch im Fettgewebe und im Darm beobachtet. Im Fettgewebe treten *Mitosen poly-*

*ploider Kerne* auf, und zwar teilen sich bis zum 3., in seltenen Fällen auch bis zum 4. Larvenstadium einzelne der seit dem Schlüpfen der Larven durchweg bereits mindestens tetra- bis oktaploiden Kerne (Abb. 13). Die übrigen vergrößern sich, wie alle Kerne des Fettgewebes in den beiden letzten Larvenstadien, durch Endomitosen. Bei den mitotischen Teilungen der polyploiden Kerne findet *keine somatische*



Abb. 14a—c. Mitosen mit mehrpoligen Spindeln in der Epidermis. a Metaphase; b Anaphase (einzelne Teile der Tochterplatten schon pyknotisch); c Anaphase bei zahlenmäßig gleicher Verteilung der Chromosomen auf drei Tochterplatten (je 16). Feulgen-Lichtgrün.

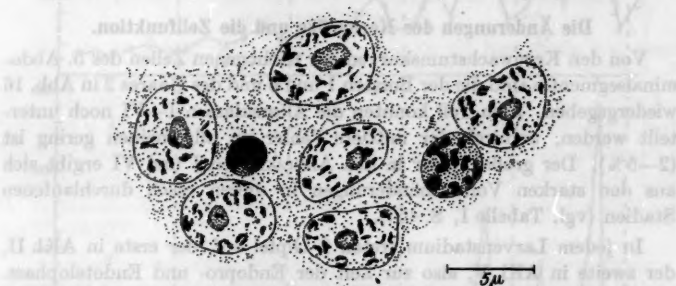


Abb. 15. Ein Stück Epidermis mit 2 degenerierenden Kernen in verschiedenen Stadien. Feulgen-Lichtgrün.

*Reduktion* statt. Es finden sich weder Kerne der Stufe  $16n$  in mitotischer Prophase, aus denen Kerne der Stufe  $8n$  durch somatische Reduktion hervorgehen könnten, noch diploide Tochterplatten in Telo-phasen, die auf eine abgelaufene Reduktion würden schließen lassen. Die Tochterkerne enthalten also offenbar stets die gleiche Anzahl von Chromosomen wie die Ausgangskerne. Die Metaphasechromosomen sind im Fettgewebe sehr viel dicker als in der Epidermis. Aus der Größe der Äquatorialplatten allein kann daher nicht auf die Zahl der Chromosomen geschlossen werden.

Mitosen mit *mehrpolygonen Spindeln* kommen mitunter im Fettgewebe, besonders aber in der diploiden Epidermis vor (Abb. 14). Sie finden sich bei etwa 5—10% aller Tiere. Wo sie auftreten, sind sie meist an

einer Stelle im Tier gehäuft. Bei einer Larve war etwa jede 4. Epidermismitose anomal. In solchen Mitosen mit 3- oder 4-poligen Spindeln werden die Chromosomen ungleich verteilt; die Kerne gehen schon in der frühen Anaphase zugrunde. Es wurde auch ein Triaster gefunden, in dem sich die Chromosomen quantitativ gleich auf 3 Tochterplatten verteilt hatten (Abb. 14c). Hier zeigte sich in der Anaphase noch keinerlei Pyknose.

GEITLER (1939) hat mehrpolige Spindeln nur bei polyploiden Kernen beschrieben, wo sich das Cytozentrum offenbar zusammen mit den Chromosomen teilt.

Wie schon WIGGLESWORTH (1942) feststellte, tritt während jeder Mitosenperiode eine *Degeneration von Kernen* in der Epidermis ein. Ein Teil der Tochterkerne wird pyknotisch und stirbt rasch ab (Abb. 15). Da immer nur einer von 2 Tochterkernen degeneriert, handelt es sich vermutlich nicht um eine falsche Verteilung der Chromosomen wie bei den Mitosen mit mehrpoligen Spindeln.

#### Die Änderungen der Kerngröße und die Zellfunktion.

Von den Kernwachstumskurven der trichogenen Zellen des 5. Abdominalsegmentes sind die der Borsten 1 und 6 und des Haares 2 in Abb. 16 wiedergegeben. Zum Teil konnten die Altersklassen I—VI noch unterteilt werden, wodurch der mittlere Fehler im allgemeinen gering ist (2—5%). Der große Fehler in den Altersklassen I und VI ergibt sich aus den starken Volumenänderungen in diesen rasch durchlaufenen Stadien (vgl. Tabelle 1, S. 457).

In jedem Larvenstadium treten 2 Gipfel auf, der erste in AKI. II, der zweite in AKI. V, also zur Zeit der Endopro- und Endotelophase. Die Gipfel können aber nicht durch diese beiden Phasen bedingt sein, da sie auch in Larvenstadien erscheinen, in denen keine Endomitose stattfindet (vgl. Tabelle 2, S. 473). Folglich muß es sich hier um *funktionelle Kernvergrößerungen* handeln. Das erste Maximum fällt in das Stadium der Vermehrung der Ribonukleinsäure im Plasma, das zweite in die Zeit des Auswachsens und der Chitinisierung der Borste.

Zwischen den Volumina der verschiedenen Borstenkerne in den verschiedenen Larvenstadien in AKI. V und der im gleichen Stadium von ihren Zellen gebildeten Menge Cuticularsubstanz — dem Volumen der zugehörigen Borste des nächsten Larvenstadiums — besteht eine positive Korrelation. Graphisch dargestellt erhält man bei doppelt logarithmischer Auftragung eine Gerade, die etwa einer Funktion der 3. Potenz entspricht (Abb. 17). Eingezeichnet ist die Funktion  $B = 10^{-5} K^3$ . Das Volumen der Borste nimmt mit der 3. Potenz des Kernvolumens in AKI. V zu.

Vergleicht man das Volumen jedes Kernes in den verschiedenen Larvenstadien in AKI. II mit dem von ihm erreichten Volumen in AKI. V,

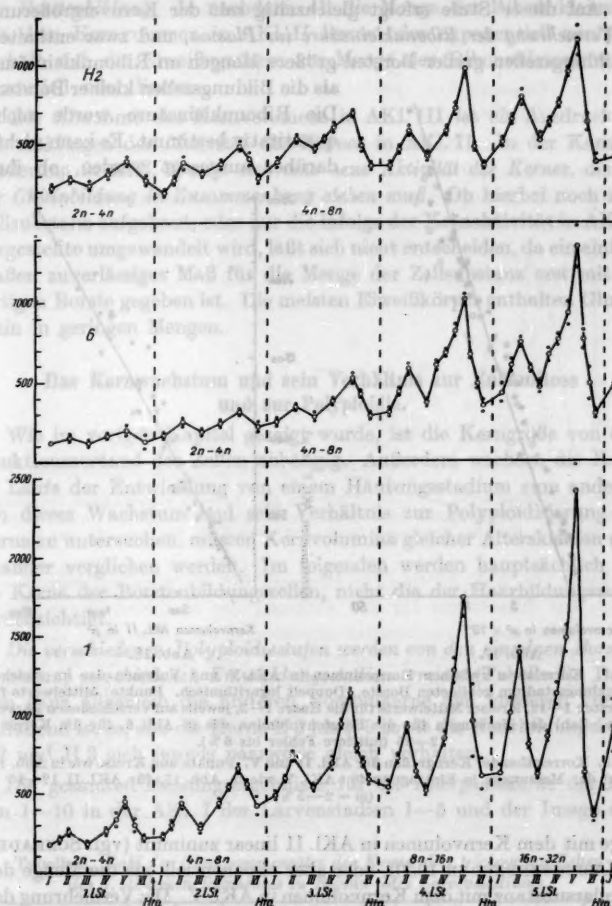


Abb. 16. Kernwachstumskurven der Borsten 1 und 6 und des Haares 2 mit den Spielräumen der wahren Mittelwerte ( $M \pm 3m$ ; wo diese nicht eingezeichnet sind, liegen sie innerhalb der die Mittelwerte bezeichnenden Kreise). Ordinate: Kernvolumen in  $\mu^3$ . Abszisse: die Larvenstadien, unterteilt in Altersklassen (vgl. Tabelle 1). Die nur in bestimmten Larvenstadien stattfindenden Endomitosen sind eingetragen.

so ergibt sich insgesamt eine positive lineare Korrelation (Abb. 18). Folglich nimmt das Volumen der Borste auch mit der 3. Potenz des

Kernvolumens in AKI. II zu. Die Menge an Cuticularsubstanz wird also durch einen Faktor bestimmt, dessen Wirksamkeit schon in AKI. II einsetzt. Auf dieser Stufe erfolgt gleichzeitig mit der Kernvergrößerung eine Vermehrung der Ribonukleinsäure im Plasma, und zwar enthalten die Bildungszellen großer Borsten größere Mengen an Ribonukleinsäure als die Bildungszellen kleiner Borsten. Die Ribonukleinsäure wurde nicht quantitativ bestimmt. Es kann nichts darüber ausgesagt werden, ob ihre

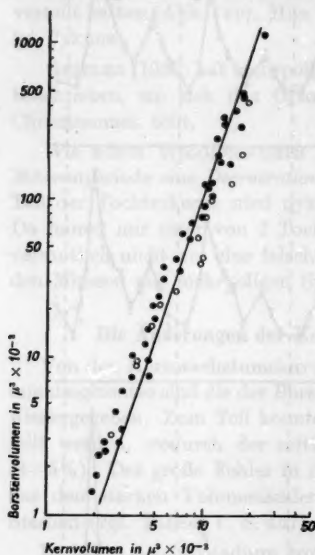


Abb. 17.

Abb. 17. Korrelation zwischen Kernvolumen in AKI. V und Volumen der im gleichen Entwicklungsstadium gebildeten Borste. Doppelt logarithmisch. Punkte: Mittelwerte für die Borsten 1—10, Kreise: Mittelwerte für die Haare 1—3, jeweils auf verschiedenen Larvenstadien. Zahl der Messungen für die Borstenvolumina wie in Abb. 6, für die Kerne je 12—25 (mittlere Fehler bis 6%).

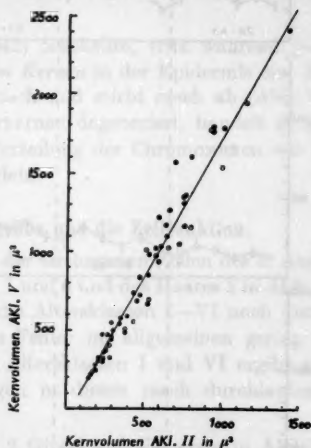


Abb. 18.

Abb. 18. Korrelation der Kerngrößen der AKI. II und V. Punkte und Kreise wie in Abb. 17. Zahl der Messungen je Eintragung für AKI. V wie in Abb. 17, für AKI. II 12—15 ( $m = 2-5\%$ ).

Menge mit dem Kernvolumen in AKI. II linear zunimmt (vgl. SCHRADER und LEUCHTENBERGER 1950), oder aber exponentiell wie die Menge der Cuticularsubstanz mit dem Kernvolumen in AKI. V. Die Vermehrung der Ribonukleinsäure hat eine verstärkte Eiweißsynthese zur Folge (vgl. u. a. CASPERSSON 1941). Wie auch Abb. 8 zeigt, nimmt das Volumen der trichogenen Zellen mit dem Auftreten der Ribonukleinsäure stark zu. Nach dem Auswachsen der Borsten in AKI. V vermindert sich das Zellvolumen wieder. Die überschüssigen Proteine werden offenbar hauptsächlich für die Ausbildung der Cuticula verwendet, die neben Chitin



(= acetyliertes Glucosamin) große Mengen Eiweiß enthält (WIGGLES-WORTH 1948). *Die Ribonukleinsäurevermehrung ist also eine Vorbereitung zur Borstenbildung.* Je nachdem, ob die Menge der Ribonukleinsäure mit dem Kernvolumen in AKI. II linear oder exponentiell zunimmt, verhält sich die Eiweißsynthese zur Menge der Ribonukleinsäure exponentiell oder linear.

Die Abnahme des Kernvolumens in AKI. III ist ein Ausdruck für das Abklingen der Aktivität des Kernes in AKI. II. In der Kernvergrößerung in AKI. V zeigt sich eine neue Aktivität des Kernes, die mit der Chitinbildung in Zusammenhang stehen muß. Ob hierbei noch neue Zellsubstanz aufgebaut, oder nur die infolge der Kernaktivität in AKI. II hergestellte umgewandelt wird, läßt sich nicht entscheiden, da ein einigermaßen zuverlässiges Maß für die Menge der Zellsubstanz erst mit der fertigen Borste gegeben ist. Die meisten Eiweißkörper enthalten Glucosamin in geringen Mengen.

#### Das Kernwachstum und sein Verhältnis zur Endomitose und zur Polyloidie.

Wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde, ist die Kerngröße von dem Funktionszustand der Zellen abhängig. Außerdem wachsen die Kerne im Laufe der Entwicklung von einem Häutungsstadium zum anderen. Um dieses Wachstum und sein Verhältnis zur Polyloidisierung der Kerne zu untersuchen, müssen Kernvolumina gleicher Altersklassen miteinander verglichen werden. Im folgenden werden hauptsächlich nur die Kerne der Borstenbildungszellen, nicht die der Haarbildungszellen berücksichtigt.

Die verschiedenen Polyloidiestufen werden von den einzelnen Borstenkernen auf verschiedenen Entwicklungsstadien erreicht (Tabelle 2). Dabei eilen ganz allgemein die hinteren Borstenkerne den vorderen voraus. Auffallend ist es, daß die Kerne B 2 bis B 9 sowie die Haarbildungskerne H 2 und H 3 sich jeweils paarweise gleich verhalten.

Die gesamten Messungsergebnisse für die Interphasekerne der Borsten 1–10 in der AKI. I der Larvenstadien 1–5 und der Imago sind

Tabelle 2. Zahl der Chromosomensätze der Kerne aller trichogenen Zellen des 5. Abdominalsegmentes zu Beginn jedes Larvenstadiums.

	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7	B 8	B 9	B 10	H 1	H 2	H 3
1. Larvenstadium	2	2	2	2	2	2					4	2	2
2. Larvenstadium	4	4	4	2	2	2	2	2			4	4	4
3. Larvenstadium	8	8	8	4	4	4	4	2	2		8	4	4
4. Larvenstadium	8	8	8	8	8	8	8	4	4	4	8	8	8
5. Larvenstadium	16	16	16	8	8	8	8	8	8	4	16	8	8
Imago . . . . .	32	16	16	16	16	8	8	8	8	8	16	8	8

in Abb. 19 in Form von Variationskurven für die Kerngrößen der Polyploidiestufen  $2n$  bis  $32n$  zusammengestellt. Die Mittelwerte der Kurven für die einzelnen Stufen sowie ihre Verhältniswerte sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

	$2n$	$4n$	$8n$	$16n$	$32n$
Volumen, $\mu^3$	180	253	416	533	933
Verhältniswert	1	1,4	2,3	3,0	5,2

*Im Mittel nimmt das Volumen der Interphasekerne von Stufe zu Stufe mit dem Faktor 1,52 zu.*

Wie Abb. 19 zeigt, variiert die Größe der Kerne der einzelnen Polyploidiestufen teilweise erheblich. Diese Variabilität hat im wesentlichen

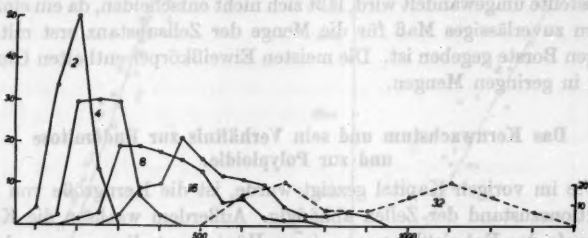


Abb. 19. Variationskurven der Kernvolumina in AKI. I für die verschiedenen Polyploidiestufen. Abszisse: Kernvolumen in  $\mu^3$ , Ordinate: Häufigkeit in Prozent (rechte Ordinate für  $32n$ ). Zahl der Messungen für  $2n$  118,  $4n$  146,  $8n$  296,  $16n$  103,  $32n$  21.

2 Gründe. In Abb. 20 sind, in Gruppen für die verschiedenen Kernstufen, die Mittelwerte für das Volumen der einzelnen Borstenkerne der verschiedenen Larvenstadien eingetragen. *Im allgemeinen nimmt die mittlere Kerngröße in jedem Larvenstadium unter den Kernen der gleichen Stufe von hinten nach vorne ab.* Die Regel tritt besonders deutlich etwa bei den Kernen der Stufe  $4n$  sowie bei denen der Stufe  $8n$  im 3. und 4. Larvenstadium hervor. Verfolgt man weiterhin die Werte für die einzelnen Borstenkerne, so zeigt sich, daß die Kerne beim Übergang von einem Larvenstadium zum folgenden stets an Größe zunehmen, gleichgültig, ob eine Endomitose stattfindet oder nicht. *Die Kerne wachsen also auch ohne Endomitose.*

Kerne, die in dem untersuchten Larvenstadium keine Endomitose durchmachen, sind in Abb. 20 durch Punkte, die zur Endomitose übergehenden durch Kreise markiert. Hier zeigt sich, daß im allgemeinen die Kerne, denen eine Endomitose bevorsteht, größer sind als diejenigen, die noch auf der erreichten Stufe verharren. Für die einzelnen Polyploidiestufen lassen sich, unabhängig von dem jeweils untersuchten Larvenstadium, bestimmte Bereiche der Kerngrößen angeben, deren Überschreitung bei allen oder der Mehrzahl der Kerne mit einer Endo-

mitose verknüpft ist. Daraus ist zu schließen, daß im allgemeinen eine Endomitose eintritt, wenn ein Kern eine bestimmte Größenschwelle überschritten hat. Der Wachstumsschritt, mit dem diese Größe erreicht wird, kann mit oder ohne Endomitose vollzogen werden. Die Endomitose wird also durch das Kernwachstum als solches ausgelöst. Um die

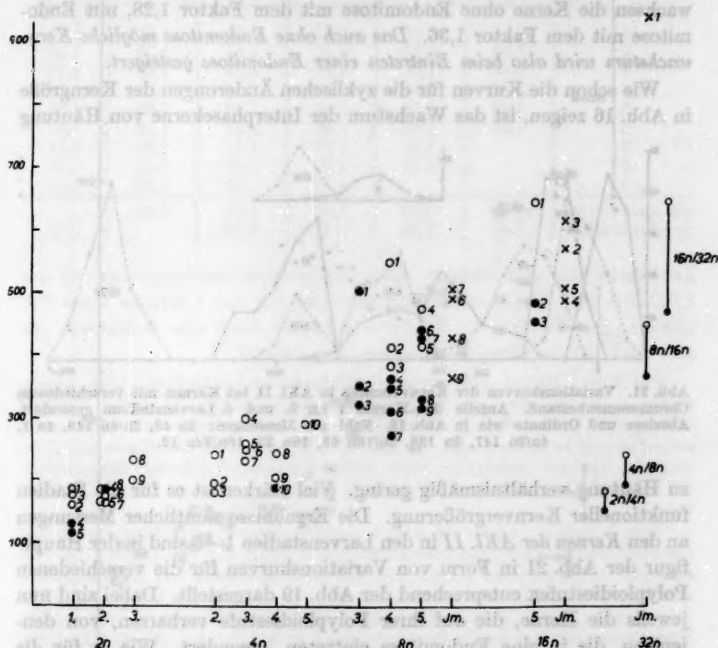


Abb. 20. Mittleres Volumen ( $\mu^3$ ) der Bildungskerne der Borsten 1—9 in AKL I, getrennt nach Kernstufen (2n bis 32n) und Entwicklungsstadien (1.—5. Larvenstadium und Imago). Die durch Kreise markierten Kerne gehen im untersuchten Larvenstadium zur Endomitose über, die durch Punkte markierten nicht. Kreuze: imaginale Kerne. In den rechts angezeichneten Spielräumen des Kernvolumens liegen die Schwellenwerte für Auslösung der beigefügten Endomitoseschritte. Mittelwerte aus je 10—25 Messungen ( $m = 5-20\%$ ).

Bereiche anzudeuten, innerhalb deren die verschiedenen Schwellenwerte liegen, sind am rechten Rand der Abb. 20 für jede Polyploidiestufe die durchschnittlichen Lagen der Mittelwerte für die während des folgenden Stadiums auf ihre Polyploidiestufe verharrenden Borstenkerne und für die zur Endomitose übergehenden eingetragen und durch eine Linie verbunden. Ungefähr in der Mitte dieser Linien müssen die einzelnen Schwellenwerte liegen. Ein zweiter für das Verhältnis von Kernstufe und Volumen charakteristischer Punkt ist die obere Grenze des Volumen-

bereichs, der von Kernen einer bestimmten Stufe besetzt wird; er kommt später zur Sprache.

Das Kernwachstum wirkt aber nicht nur auf die Endomitoseetätigkeit der Zelle ein, sondern umgekehrt wird auch das Kernwachstum seinerseits durch die Endomitoseetätigkeit beeinflusst. Im Durchschnitt wachsen die Kerne ohne Endomitose mit dem Faktor 1,28, mit Endomitose mit dem Faktor 1,36. *Das auch ohne Endomitose mögliche Kernwachstum wird also beim Eintreten einer Endomitose gesteigert.*

Wie schon die Kurven für die zyklischen Änderungen der Kerngröße in Abb. 16 zeigen, ist das Wachstum der Interphasekerne von Häutung

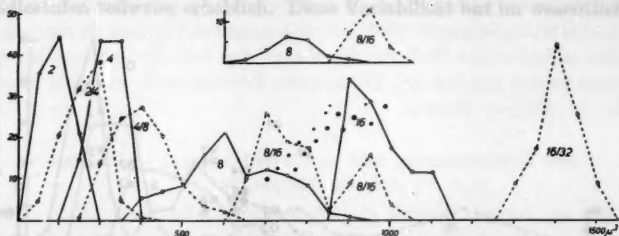


Abb. 21. Variationskurven der Kernvolumina in AKI. II bei Kernen mit verschiedenem Chromosomenbestand. Anteile des Kernes 1 im 3. und 4. Larvenstadium gesondert. Abzisse und Ordinate wie in Abb. 19. Zahl der Messungen: 2n 48, 2n/4n 148, 4n 7, 4n/8n 147, 8n 138, 8n/16n 63, 16n 23, 16n/32n 12.

zu Häutung verhältnismäßig gering. Viel stärker ist es für die Stadien funktioneller Kernvergrößerung. Die Ergebnisse sämtlicher Messungen an den Kernen der AKI. II in den Larvenstadien 1—5 sind in der Hauptfigur der Abb. 21 in Form von Variationskurven für die verschiedenen Polyploidiestufen entsprechend der Abb. 19 dargestellt. Dabei sind nun jeweils die Kerne, die auf ihrer Polyploidiestufe verharren, von denjenigen, die in eine Endomitose eintreten, gesondert. Wie es für die Interphasekerne schon aus Abb. 20 ersichtlich war, sind die letzten im Mittel jeweils größer als die ersten. Die Mittelwerte der Variationsreihen betragen für die Kernzustände

2n—2n	2n—4n	4n—4n	4n—8n	8n—8n	8n—16n	16n—16n	16n—32n
178	280	304	399	619	780	970	1404

*Der Vergrößerungsfaktor für den Übergang von einer Polyploidiestufe zur folgenden beträgt im Durchschnitt für die Kerne ohne Endomitose 1,78, für die mit Endomitose 1,74. Beide Werte liegen deutlich höher als bei den Interphasekernen.*

In Abb. 22 sind entsprechend wie in Abb. 20 die Mittelwerte für die einzelnen Borsten der verschiedenen Larvenstadien zusammengestellt. Die wie in Abb. 20 vorgenommenen Eintragungen am rechten Rand der

Figur geben jetzt einen Anhalt für den Größenunterschied von Kernen einer Polyploidiestufe mit und ohne beginnende Endomitose. Von einem Schwellenwert der Kerngröße kann in diesem Stadium nicht die Rede sein, da die Entscheidung, ob eine Endomitose eintritt oder nicht, schon

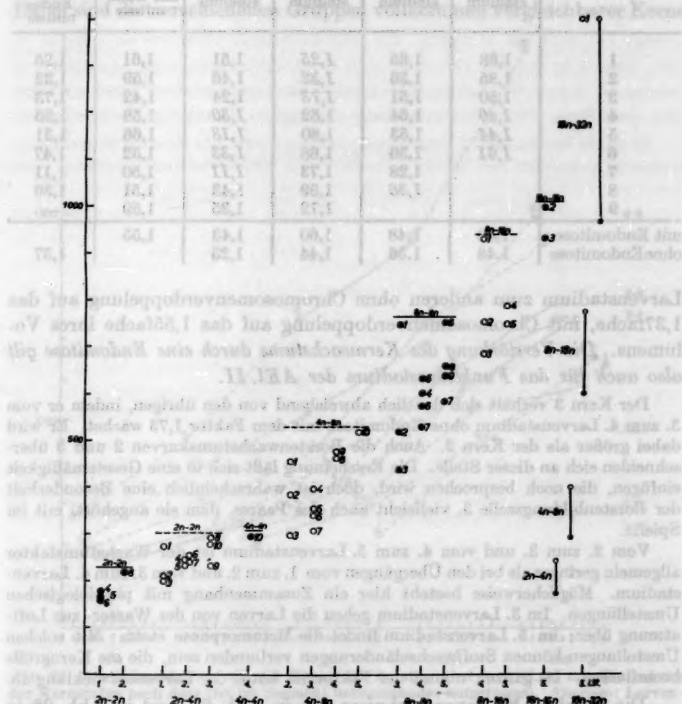


Abb. 22. Mittleres Volumen ( $\mu^3$ ) für die Bildungskerne der Borsten 1–9 in AKI II, getrennt nach Chromosomenbestand und Larvenstadium. Kreise und Punkte wie in Abb. 20. Die Eintragungen rechts sind Maße der Größenunterschiede zwischen Kernen der gleichen Stufe, die in Endomitose und Pseudoendomitose eintreten. Bei den einzelnen Kerngrößen sind die Grenzen eingetragen, bis zu denen die Kerne bei gegebenem Chromosomenbestand vergrößert werden. Zahl der Messungen wie in Abb. 18.

gefallen ist. Charakteristische Punkte für die Variabilität der Kerngröße sind aber auch hier die Grenzen, bis zu denen die Kerne mit verschiedenen Chromosomenausstattungen funktionell vergrößert werden. Sie sind in Abb. 22 bei den einzelnen Kerngrößen eingezeichnet.

Tabelle 3 enthält sämtliche Zuwachsfaktoren für die einzelnen Wachstumsschritte. Durchschnittlich wachsen die Kerne von einem

Tabelle 3. Wachstumsfaktoren von AKI. II zu AKI. II aller Borstenbildungszellkerne; Wachstumsfaktoren ohne Endomitose schräg gedruckt.

Borste	1./2. Larvenstadium	2./3. Larvenstadium	3./4. Larvenstadium	4./5. Larvenstadium	Durchschnitt	
					mit Endomitose	ohne Endomitose
1	1,68	1,65	1,25	1,51	1,61	1,25
2	1,85	1,36	1,32	1,46	1,59	1,32
3	1,50	1,51	1,73	1,24	1,42	1,73
4	1,40	1,64	1,52	1,30	1,58	1,35
5	1,44	1,53	1,80	1,18	1,66	1,31
6	1,61	1,36	1,68	1,33	1,52	1,47
7		1,28	1,73	1,11	1,50	1,11
8		1,36	1,59	1,43	1,51	1,36
9			1,72	1,35	1,59	—
mit Endomitose	1,68	1,48	1,60	1,43	1,55	
ohne Endomitose	1,48	1,36	1,44	1,23		1,37

Larvenstadium zum anderen ohne Chromosomenverdoppelung auf das 1,37fache, mit Chromosomenverdoppelung auf das 1,55fache ihres Volumens. Die Verstärkung des Kernwachstums durch eine Endomitose gilt also auch für das Funktionsstadium der AKI. II.

Der Kern 3 verhält sich deutlich abweichend von den übrigen, indem er vom 3. zum 4. Larvenstadium ohne Endomitose mit dem Faktor 1,73 wächst. Er wird dabei größer als der Kern 2. Auch die Borstenwachstumskurven 2 und 3 überschneiden sich an dieser Stelle. Die Erscheinung läßt sich in eine Gesetzmäßigkeit einfügen, die noch besprochen wird, doch ist wahrscheinlich eine Besonderheit der Borstenbildungszelle 3, vielleicht auch des Paares, dem sie angehört, mit im Spiel.

Vom 2. zum 3. und vom 4. zum 5. Larvenstadium ist der Wachstumsfaktor allgemein geringer als bei den Übergängen vom 1. zum 2. und vom 3. zum 4. Larvenstadium. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit physiologischen Umstellungen. Im 3. Larvenstadium gehen die Larven von der Wasser- zur Luftatmung über; im 5. Larvenstadium findet die Metamorphose statt. Mit solchen Umstellungen können Stoffwechseländerungen verbunden sein, die die Kerngröße beeinflussen. Im ganzen nimmt der Faktor im Laufe der Larvenentwicklung ab.

Die gleichen Messungsergebnisse wie in Abb. 22 sind in Abb. 23 in Form von Wachstumskurven für die Borstenkerne 1—9 dargestellt. Die Kurven veranschaulichen das Wachstum der Kerne in der Abfolge der Funktionsstadien der AKI. II. Bei ihrer Betrachtung fällt auf, daß vergleichbare Kurvenabschnitte vielfach nicht in dem Maße divergieren wie es bei der Art der Darstellung im Fall gleicher Wachstumsfaktoren zu erwarten wäre, oder sogar konvergieren. So verhalten sich im 2. Larvenstadium Kurve 1 und 2 sowie 4, 5 und 6, im 4. Larvenstadium 2 und 3, ferner 4 und 5 und schließlich 8 und 9. Die verglichenen Kurvenabschnitte enden im allgemeinen in der Nähe der Grenzen, bis zu denen die Kerne ihrer Chromosomenausstattung entsprechend im Funktionsstadium der AKI. II heranwachsen.



Der Wachstumsfaktor, der den betrachteten Zuwachs bestimmt, erscheint demnach um so kleiner, je größer der Kern am Ausgang war. Um diese Verhältnisse noch einmal deutlich zu machen, ist in Abb. 24 die Korrelation von Kerngröße und folgendem Zuwachs dargestellt. Dabei sind die verschiedenen Gruppen vollkommen vergleichbarer Kerne

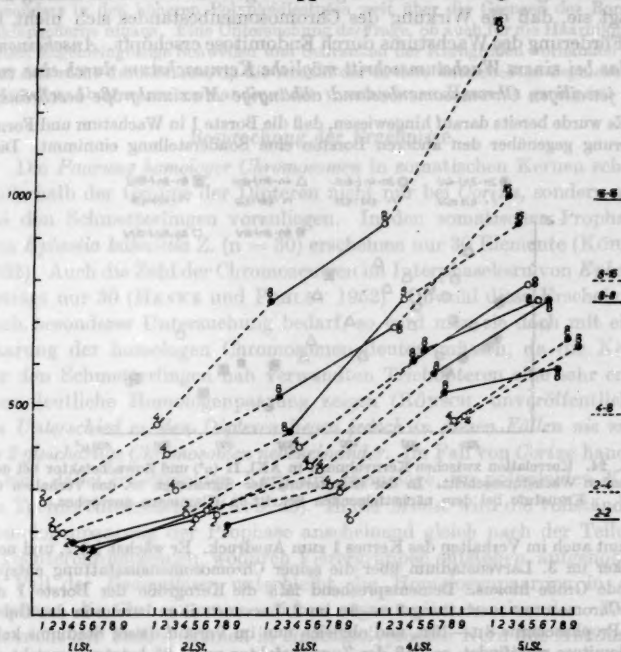


Abb. 23. Wachstumskurven für die Kerne der Borsten 1-9 in AKI. II mit Eintragung der Kernstufen nach dem Ort im Segment nebeneinander aufgetragen. Abszisse: Larvenstadien, Ordinate: Kernvolumen in  $\mu^3$ . Kreise und Punkte wie in Abb. 20. Wachstumschritte mit Endomitose gestrichelt, ohne Endomitose ausgezogen. Rechts eingetragen die Grenzen, bis zu denen die Kerne bei gleichem Chromosomenbestand vergrößert werden.

durch verschiedene Signaturen gesondert. Auch das unterschiedliche Verhalten der am Ende des geprüften Wachstumsschrittes stehenden Kerne bei dem nächstfolgenden Schritt wurde berücksichtigt, da die Kerne, die in AKI. II eine Endomitose vorbereiten, allgemein größer sind als solche, die die erreichte Stufe beibehalten. Wie die Abbildung zeigt, ist bei einigen der geprüften Gruppen eine negative Korrelation zwischen Ausgangskerngröße und Zuwachs mehr oder weniger deutlich erkennbar. Von den 4 in der Abbildung vermerkten Korrelationskoeffizienten liegen 2 bei 0,6 und höher, davon ist der eine mit dem

3fachen, der andere mit dem 2fachen mittleren Fehler gesichert; von den beiden restlichen ist der eine nicht gesichert, der andere praktisch gleich 0. Von 2 mit nur 2 Punkten besetzten Gruppen liegt die eine im Sinne einer negativen Korrelation, die andere im Gegensatz. Die Beobachtung kann also nicht als gesichert gelten. Sofern sie richtig ist, besagt sie, daß die Wirkung des Chromosomenbestandes sich nicht in der Förderung des Wachstums durch Endomitose erschöpft. *Anscheinend ist das bei einem Wachstumsschritt mögliche Kernwachstum durch eine von dem jeweiligen Chromosomenbestand abhängige Maximalgröße beschränkt.*

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Borste 1 in Wachstum und Formänderung gegenüber den anderen Borsten eine Sonderstellung einnimmt. Dies

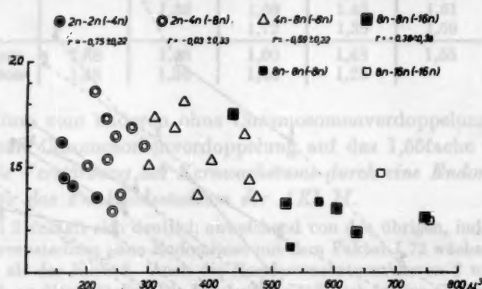


Abb. 24. Korrelation zwischen Kernvolumen in AKL II ( $\mu^3$ ) und Zuwachsfaktor bei dem folgenden Wachstumsschritt. In der Erläuterung der Signaturen ist das Verhalten der Kernstufe bei dem nächstfolgenden Schritt in Klammern angegeben.

kommt auch im Verhalten des Kernes 1 zum Ausdruck. Er wächst im 2. und noch stärker im 3. Larvenstadium über die seiner Chromosomenausstattung entsprechende Größe hinaus. Dementsprechend fällt die Kerngröße der Borste 1 mit der Chromosomenausstattung  $8n-8n$  im 3. Larvenstadium bereits in das Gebiet der Prophasekerne  $8n-16n$ , und obgleich nun im Verlauf dieses Stadiums keine Endomitose stattfindet, so daß der Zuwachsfaktor nur 1,25 beträgt, erreicht der Kern im Prophasezustand des 4. Larvenstadiums bereits die Größe der  $16n-16n$ -Kerne der Borsten 2 und 3, für die dieser letzte Wachstumsschritt zwischen dem 4. und 5. Larvenstadium liegt, in dem die Wachstumsfaktoren allgemein gering sind. Um diese Sonderstellung der Borste 1 bei der Deutung der Variationskurve für die verschiedenen Kernstufen in Abb. 21 berücksichtigen zu können, sind in der Nebenfigur die Variationskurven ihrer Kerngrößen in dem 3. und 4. Larvenstadium gesondert eingetragen. Ein Vergleich mit der Hauptfigur zeigt, daß der Nebengipfel, welcher hier an der Variationskurve der sämtlichen  $8n-8n$ -Kerne erscheint, überwiegend durch den Kern der Borste 1 bedingt ist, der Nebengipfel an der Kurve der  $8n-16n$ -Kerne sogar ausschließlich. Daß diese Nebengipfel in Hauptgebiete von Variationskurven für Kerne mit anderer Chromosomenausstattung fallen, kann rein zufällig sein und darf jedenfalls nicht als Hinweis darauf genommen werden, daß etwa bestimmte Kerngrößen unabhängig von dem Chromosomenbestand bevorzugt wären.

Das Kernwachstum erscheint bei *Corixa* im ganzen gleitend, weil die Kerne auch ohne Endomitose wachsen können. Die Förderung des

Kernwachstums durch eine Endomitose und seine Beschränkung durch die jeweilige Chromosomenausstattung zeigen aber auch hier, wie durch die sprunghafte Verdoppelung der Chromosomen das *Kernwachstum rhythmisiert* wird.

Die Kerne der Haarbildungszellen wachsen bei gleicher Chromosomenzahl besonders in den höheren Polyploidiestufen weit über die Grenzen der Borstenbildungskerne hinaus. Eine Untersuchung der Frage, ob auch für die Haarbildungszellen allgemeingültige Schwellen und Schranken der Kerngrößen vorhanden sind, ließ sich nicht durchführen, da die Anzahl der in dem untersuchten Segment auftretenden, übrigens untereinander recht verschiedenen Haare zu gering ist.

### Besprechung der Ergebnisse.

Die *Paarung homologer Chromosomen* in somatischen Kernen scheint außerhalb der Gruppe der Dipteren nicht nur bei *Coriza*, sondern auch bei den Schmetterlingen vorzuliegen. In den somatischen Prophasen von *Ephestia kühniella* Z. ( $n = 30$ ) erscheinen nur 30 Elemente (KÖHLER 1932). Auch die Zahl der Chromozentren im Interphasekern von *Ephestia* beträgt nur 30 (HENKE und POHLEY 1952). Obwohl diese Erscheinung noch besonderer Untersuchung bedarf, so wird man sie doch mit einer Paarung der homologen Chromosomen deuten müssen, da die Kerne der den Schmetterlingen nah verwandten Trichopteren eine sehr enge, aber deutliche Homologenpaarung zeigen (RÖNSCH, unveröffentlicht). Im Unterschied zu den Dipteren liegen jedoch in diesen Fällen nie mehr als 2 gleichartige Chromosomen nebeneinander. Im Fall von *Coriza* handelt es sich dabei im diploiden Kern um Homologe, im polyploiden Kern um Tochterchromosomen (Abb. 25). In der Mitose wird die vollständige Homologenpaarung der Prophase anscheinend gleich nach der Teilung in Tochterchromosomen, wodurch Vierergruppen entstehen, aufgehoben. Im Fall der Endomitosen unterbleibt die Homologenpaarung in der Prophase, die Chromosomen weichen sogar weiter auseinander. Wäre dies nicht der Fall, so kämen in einem polyploiden Kern alle Abkömmlinge eines Chromosoms nebeneinander zu liegen. Möglicherweise wäre das für die Funktion eines großen Kernes ungünstig, und es würde ein besonderer Faktor herausgebildet, der im Fall einer Endomitose für die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen im Kern sorgt. In der Pseudoendomitose verhalten sich die Chromosomen zunächst wie in der Endomitose, indem in der Prophase keine Zusammenlagerung von Homologen stattfindet. In Mitose und Endomitose erfolgt nun eine Kontraktion und Teilung der Chromosomen, so daß im Metaphasestadium (AKI. III) Chromosomenpaare erscheinen. Bei der Pseudoendomitose entstehen aber keine Tochterchromosomen; hier finden sich entweder die Homologen oder Tochterchromosomen der letzten Endomitose wieder zu Paaren zusammen.

Die Bedingungen für den Eintritt einer Endomitose sind faßbar in einem bestimmten Kernvolumen, das mit oder ohne Endomitose erreicht

werden kann. Ist es in einem bestimmten Larvenstadium nicht erreicht worden, so erfolgt im nächsten eine Pseudoendomitose, welche bis auf die Chromosomenteilung der Endomitose weitgehend gleicht.

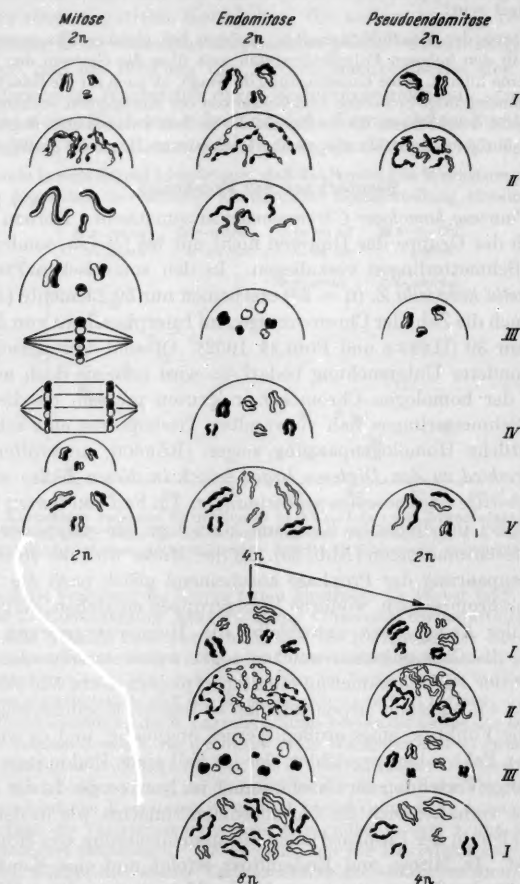


Abb. 25. Schema des Chromosomenverhaltens in Mitose, Endomitose und Pseudoendomitose. Eingezeichnet 3 Paare von Chromosomen.

Die Phasen der Endomitosen und Pseudoendomitosen verlaufen in allen Zellen gleichzeitig. Die Prophasen der mitotischen Kerne finden gleichzeitig mit den Endoprophasen statt. Die Kernteilung erfolgt jedoch rasch und nicht in allen Epidermiskernen synchron (vgl. Tabelle 1). Die Ent-

spiralisierung der Chromosomen nach der Teilung (AKI. V) erfolgt aber wieder gleichzeitig mit den endomitotischen Kernen. Diese Verhältnisse lassen schließen, daß *bestimmte von außen auf die Zellen einwirkende Faktoren die verschiedenen Formen ihrer Teilungstätigkeit einleiten und andererseits auch den Interphasezustand wiederherstellen, während der an die Spindel gebundene Teil der mitotischen Prozesse relativ autonom ist.*

Die Zellen durchlaufen in jedem Larvenstadium zwei *getrennte Arbeitsphasen*, die mit einem bestimmten, auch für den endomitotischen Zyklus kennzeichnenden Chromosomenverhalten verbunden sind. In der 1. Phase (AKI. II) wird unter Entspiralisierung der Chromosomen, die eine Auflockerung des Heterochromatins mit sich bringt, sowie unter Vergrößerung und Auflösung des Nukleolus die Bildung von Ribonukleinsäure und eine verstärkte Eiweißsynthese im Plasma hervorgerufen (vgl. CASPERSSON 1941). In der 2. Phase findet, gleichfalls unter Beteiligung des Kernes, die Ausscheidung und Chitinisierung der Cuticula statt (AKI. IV—V). In diesem Stadium findet man in allen Kernen ein Auseinanderweichen von paarweise angeordneten Chromosomen unter zunehmender Auflockerung. *Dieser Funktionszyklus ist nicht an die Endomitose gebunden, insofern er in jedem Häutungsintervall auch von denjenigen Kernen durchlaufen wird, die nur eine Pseudoendomitose durchmachen. Er verläuft aber ebenfalls in allen Zellen synchron, wird also offensichtlich von Außenfaktoren gesteuert.*

Zwischen den beiden Arbeitsphasen der Kerne, in der Zeit der Metaphase, liegt eine *Ruhepause*. Da die hier erfolgende Kontraktion der Chromosomen in Endo- und Pseudoendomitose gleichzeitig eintritt, wird anscheinend auch sie durch bestimmte Zustände des Plasmas hervorgerufen. Die Kontraktion der Chromosomen geht aber bei der Endomitose ebenso wie bei der Mitose weiter als bei der Pseudoendomitose. Dies deutet darauf hin, daß *der Vorgang der Chromosomenteilung bei der Gestaltung dieser Phase beteiligt ist.*

Eine Endomitose nimmt bei *Corixa* etwa die ganze Zeit zwischen 2 Häutungen ein, gleichgültig ob ein Larvenstadium 8 oder 14 Tage dauert. Nach den Kernwachstumskurven von RISLER (1950) erstreckt sich auch in der Larvenentwicklung von *Ptychopoda seriata* eine Endomitose über ein ganzes Larvenstadium (vgl. seine Abb. 12). *In der Larvenentwicklung der Insekten wird also die Endomitose in ihrem Ablauf verzögert. Dies kann als Anpassung der Endomitose an den in seinem zeitlichen Ablauf gebundenen Funktionszyklus der Zellen verstanden werden, der in bestimmten Phasen bestimmte Zustände der Chromosomen erfordert. Als übergeordneter Steuerungsfaktor kommen wohl die Häutungshormone in Frage.*

Die Zahl der Chromosomen wirkt sich in der Größe der Interphasekerne, hier etwa gleichbedeutend mit Ruhekernen, weniger aus als in den Stadien funktioneller Kernvergrößerungen. Nach jeder Funktionsperiode, am

Ende jedes Larvenstadiums, sinkt das Kernvolumen stark ab, im Gegensatz zu den Kernen von *Ptychopoda*. Höhere Chromosomenzahlen scheinen vor allem für die Funktionstüchtigkeit der Zellen erforderlich zu sein.

Bei den bisher gefundenen Kernwachstumskurven (WERMEL und PORTUGALOW 1935, RISLER) ist es nicht möglich, über das Verhältnis von Kernwachstum und Chromosomenteilung Aussagen zu machen, da jede Kernvergrößerung gleichzeitig mit einer Chromosomenteilung auftritt. Dadurch, daß bei *Coriza* Larvenstadien eingeschaltet sind, in denen keine Chromosomenverdoppelung stattfindet, ist hier diese Möglichkeit gegeben. Die Kerne wachsen auch ohne Chromosomenvermehrung. Wird dabei eine bestimmte Größe überschritten, so erfolgt eine Teilung der Chromosomen. Die Endomitose tritt also nicht autonom ein, sondern sie wird durch Überschreiten einer Größenschwelle ausgelöst. Jedoch haben auch die Chromosomen einen Einfluß auf die Kerngröße. Einerseits tritt durch eine Endomitose eine Förderung des Kernwachstums ein, andererseits wird wahrscheinlich das Kernwachstum durch den jeweils vorhandenen Chromosomenbestand beschränkt. Auf diese Weise wird es durch die schrittweise Verdoppelung der Chromosomen rhythmisiert. Beide Wirkungen auf das Kernwachstum kommen bei *Coriza* jedoch nur schwach zum Ausdruck. Auf den ersten Blick scheinen die Kerne fast kontinuierlich zu wachsen. Da also an Hand der Kernwachstumskurven nicht immer die Polyploidisierung erkennbar ist, können ohne Chromosomenzählungen keine sicheren Aussagen über die Polyploidiestufe eines Kernes gemacht werden. Ein Einfluß der rhythmischen Chromosomenvermehrung auf das Borstenwachstum ist bei *Coriza* nicht mehr nachzuweisen.

Im Hinblick auf die Frage nach der Determination der Größenentwicklung der Zellen ist die Beobachtung von Bedeutung, daß die zur Polyploidisierung veranlagten Kerne auf frühen Stadien dickere Chromosomen enthalten können als auf späteren. Diese Erscheinung deutet darauf hin, daß schon frühzeitig eine bestimmte Anzahl von Längselementen gebildet wird, die im Laufe der Entwicklung schrittweise auf Tochterchromosomen verteilt werden.

Im übrigen ist bei verschiedenen Geweben das Verhältnis zwischen Chromosomenbestand und Kernvolumen verschieden. Schon innerhalb eines Gewebes finden sich hierin Unterschiede. So haben die Kerne der Haarbildungszellen bei gleicher Chromosomenzahl ein größeres Volumen als die Borstenbildungszellkerne. Auch der Wachstumsfaktor dieser beiden Kernsorten ist verschieden, und schließlich unterscheiden sie sich bei gleichzeitigem Chromosomenbestand in der Dicke ihrer Chromosomen.

#### Zusammenfassung.

1. In den somatischen Kernen von *Coriza punctata* ILLIG. sind die homologen Chromosomen auf Distanz gepaart. In den mitotischen Prophasen findet eine vollständige Homologenpaarung statt.



2. Der Funktionszyklus der Epidermiszellen wurde besonders an den trichogenen Zellen untersucht. In jedem Larvenstadium durchlaufen die Zellen 2 Arbeitsphasen. In der 1. Phase wird vom Kern her unter Mitwirkung des Nukleolus die Bildung von Ribonukleinsäure im Plasma hervorgerufen; in der 2. Phase findet die Ausscheidung und Chitinisierung der Cuticula statt. Die Mitwirkung des Kernes ist außer an seiner Vergrößerung auch an dem Verhalten seiner Chromosomen kenntlich. In der 1. Phase sind die Chromosomen stark aufgelockert und entspiralisiert, in der 2. findet man in allen Kernen ein Auseinanderweichen von paarweise angeordneten Chromosomen unter zunehmender Entspiralisierung.

3. Die Kerne der trichogenen Zellen vergrößern sich unter Endomitosen. In jedem Larvenstadium findet höchstens eine Endomitose statt.

4. Die Endoprophase fällt in die 1., die Endoana- bis Endotelophase in die 2. Arbeitsphase der Zelle. Bei den Mitosen der Epidermiskerne fällt die Prophase ebenfalls in die 1. Arbeitsphase, Meta- und Anaphase werden rasch durchlaufen, aber die Entspiralisierung nach der Telophase wird bis zur 2. Arbeitsphase aufgeschoben. Nur die an die Spindel gebundenen Teilprozesse der Mitose sind also relativ autonom.

5. In Kernen trichogener Zellen, deren Chromosomen sich nicht teilen, machen die Chromosomen synchron mit denen der zur Endomitose schreitenden Kerne einen Formwechsel durch, der einer Endomitose ähnlich ist. Der Prozeß wird als Pseudoendomitose bezeichnet.

6. In polyploiden Kernen verhalten sich bei Endomitosen und Pseudoendomitosen die Schwesterchromosomen der letzten Endomitose so zueinander wie die Homologen in diploiden Kernen.

7. Die trichogenen Zellen, die von ihnen gebildeten Borsten und ihre Kerne wachsen mit jedem Häutungsschritt. Bei Überschreiten einer Größenschwelle folgt in den Kernen eine Chromosomenteilung. Die Endomitose wird also von der Zelle her ausgelöst.

8. Das mit einem Häutungsschritt verknüpfte Kernwachstum wird einerseits durch eine Endomitose gesteigert, andererseits ist es wahrscheinlich durch eine dem jeweiligen Chromosomenbestand entsprechende Maximalgröße beschränkt. Damit wird gezeigt, wie die Rhythmisierung des Kernwachstums durch Chromosomenteilungen vor sich geht.

9. Die Chromosomen der Kerne, die sich unter Endomitosen vergrößern, sind im frühen diploiden Kernzustand dicker als später im polyploiden Kern. Dabei scheint ihr Durchmesser etwa der endgültigen Chromosomenzahl zu entsprechen.

#### Literatur.

- BRACHET, J.: La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie de développement. *Arch. de Biol.* 53, 207—257 (1942). — CASPERSSON, T.: Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. *Naturwiss.* 29, 33—43 (1941). — FROLOWA, S.: Die Polyploidie einiger Gewebe

- bei Dipteren. Z. Zellforsch. 8, 542—565 (1929). — GETTLER, L.: Die Entstehung der polyploiden somatischen Zellkerne bei Heteropteren durch wiederholte Chromosomenteilung ohne Spindelbildung und Kernteilung. Naturwiss. 26, 722—723 (1938). — Die Entstehung der polyploiden Somakerne durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. Chromosoma 1, 1—22 (1939). — HENKE, K.: Über die Größenbeziehungen von Schuppe und Balg auf dem Flügel der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Physik. Kl. 1945, 20—37. — HENKE, K., u. I. MERTZ: Über die Kerngrößenunterschiede im Flügelepithel der Mehlmotte und ihre Beziehungen zur Größendifferenzierung der Schuppen. Biol. Zbl. 61, 40—64 (1941). — HENKE, K., u. H. J. POHLEY: Differentielle Zellteilungen und Polyploidie bei der Schuppenbildung der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Z. Naturforsch. 7b, 65—79 (1952). — HENKE, K., u. G. RÖNSCH: Über die Bildungsgleichheiten in der Entwicklung epidermaler Organe und die Entstehung des Nervensystems im Flügel der Insekten. Naturwiss. 38, 335—336 (1951). — JACOB, W.: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Arch. Entw.mechan. 106, 124—192 (1925). — KAUFMANN, B. P., M. R. McDONALD und H. GAY: The ribonucleic acid content of chromosomes. Genetics 33, 615 (1948). — KÖHLER, W.: Die Entwicklung der Flügel bei der Mehlmotte *Ephestia kühniella* ZELLER mit besonderer Berücksichtigung des Zeichnungsmusters. Z. Morph. u. Ökol. Tiere 24, 582—681 (1932). — KRUMIN, R.: Die Borstenentwicklung bei der Wachsmotte *Galleria mellonella* L. Biol. Zbl. 71, 183—210 (1952). — PROKOFEWA, A.: Vergleichend karyologische Studien von elf Arten der Familie *Corixidae* (Hemiptera, Heteroptera). Z. Zellforsch. 19, 1—27 (1933). — RISLER, H.: Kernvolumenänderungen in der Larvenentwicklung von *Ptychopoda seriata* SCHREK. Biol. Zbl. 69, 11—28 (1950). — SCHNEIDER, W. C.: Extraction and estimation of desoxyribose nucleic acid and pentose nucleic acid. J. of Biol. Chem. 161, 293—303 (1945). — SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: A cytochemical analysis of the functional interrelation of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (DE GEER). Exper. Cell. Res. 1, 421—452 (1950). — SLACK, H. D.: The association of non-homologous chromosomes in *Corixidae* (Hemiptera, Heteroptera). Proc. Roy. Soc. Edinburgh B 58, 192—212 (1938). — STICH, H.: Das Vorkommen von Ribonukleinsäuren in Kernsaft und Spindel sich teilender Kerne von *Cyclops strenuus*. Z. Naturforsch. 6b, 319—326 (1951a). — Experimentelle karyologische und cytochemische Untersuchungen an *Acetabularia mediterranea*; ein Beitrag zur Beziehung zwischen Kerngröße und Eiweißsynthese. Z. Naturforsch. 6b, 319—326 (1951b). — STOSSBERG, M.: Über die Entwicklung der Schmetterlingsschuppen. Biol. Zbl. 57, 393—402 (1937). — Die Zellvorgänge bei der Entwicklung der Flügelschuppen von *Ephestia kühniella* Z. Z. Morph. u. Ökol. Tiere 24, 173—206 (1938). — TANNER, E.: Kerngröße und Zellfunktion. Inaug.-Diss. der medizinischen Fakultät Bern, Zusammenfassung. 1939. — WERMEL, E. M., u. L. W. SCHERSCHULSKAJA: Studien über Zellengröße und Zellenwachstum, VIII. Mitt.: Über proportionelles (rhythmisches) Zellenwachstum. Z. Zellforsch. 20, 459—466 (1934). — WERMEL, E. M., u. W. W. PORTUGALOW: Studien über Zellengröße und Zellenwachstum, XII. Mitt.: Über den Nachweis des rhythmischen Zellenwachstums. Z. Zellforsch. 22, 185—194 (1935). — WIGGLESWORTH, V. B.: The significance of "chromatic droplets" in the growth of insects. Quart. J. Microsc. Sci. 83, 141—152 (1942). — The insect cuticle. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 23, 408—451 (1948).

Frau Dr. CHRISTINE LIPP,

Zoologisches Institut der Universität Göttingen, Bahnhofstraße 28.

From the Department of Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey,  
and The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass.

**POLARIZATION OPTICAL STUDIES OF THE MITOTIC SPINDLE.  
I. THE DEMONSTRATION OF SPINDLE FIBERS IN LIVING CELLS\*.**

By

SHINYA INOUÉ.

With 15 figures in the text.

(Eingegangen am 20. November 1952.)

**Introduction.**

The mechanism of chromosome movement and cell division can not be understood without an adequate knowledge of the structure of the mitotic spindle. Various optical conditions prevailing in most living cells, however, make direct microscopical observation of the spindle extremely difficult. Thus, aside from a few exceptional cases (COOPER 1941, CLEVELAND 1938), the structure of the spindle has not been satisfactorily demonstrated in most living cells. This has led many to believe that the living spindle is structureless, and that the spindle fibers and fibrils which can be demonstrated so clearly after fixation and staining do not reflect the true architecture of the cell before fixation.

The difficulty of seeing structure in the spindle of living cells with a regular microscope, however, need not necessarily be taken to mean that the spindle is structureless. In fact, as reviewed by SCHRADER (1944) and by CORNMAN (1944), there exist a number of observations favoring the view that some kind of fibrous organization must in fact exist in the living spindle during the normal course of its function. The evidence is for the most part indirect and includes: the mechanical anisotropy of the spindle that BĚLAŘ (1929a) showed following action of hypertonic media, and by his observation of non-random Brownian motion within the spindle (BĚLAŘ 1929b); the optical anisotropy in living spindles demonstrated by SCHMIDT (1939, 1941) and others;

\* The main portion of the paper was presented to the faculty of Princeton University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. This research was supported in part by funds of the Eugene Higgins Trust allocated to Princeton University. Thanks are also extended to the American Philosophical Society for use of equipment purchased under a grant awarded to Dr. K. W. COOPER. I am also indebted to Dr. RALPH O. ERICKSON of the University of Pennsylvania and Dr. HERSCHEL L. ROMAN of the University of Washington for supplying the plant material. Some of the observations described in this paper were done at the present address.

observations on the organization of individual chromosomal fibers in fixed material (SCHRADER 1932); the curved appearance of the spindle fibers and their presumed independent behaviour in cells fixed after centrifugation (MORGAN 1910, CONKLIN 1917, SCHRADER 1934, SHIMAMURA 1940); and finally, microdissection studies of the living cell (WADA 1935, CARLSON 1952).

Now, since the spindle and astral rays are weakly birefringent, their structure should be observable under a sensitive polarization microscope. SCHMIDT (1939), HUGHES and SWANN (1948), INOUÉ and DAN (1951), and SWANN (1951a, 1951b) have studied changes in the birefringence of the spindle and asters and related them to possible physical and chemical changes in the cell during division. Unfortunately, the instruments and technique used by these authors did not provide adequate resolution, and discrete spindle fibers could not be observed in most of these cases.

An analysis of the limiting factors in polarization microscopy (INOUE 1952a, 1952b) has led to the design of an improved polarization microscope for cytological purposes. With the increased resolution and sensitivity achieved by the new instrument, I have been able to observe the detailed structure of the spindle in living cells and to follow its change during mitosis. In various types of animal and plant cells, spindle fibers are clearly visible with this microscope, and their relation to the chromosomes during anaphase can be established with great certainty.

In the following, the structure of the metaphase and anaphase spindle in the oöcyte of the marine annelid, *Chaetopterus pergamentaceus*, and in the pollen mother cell of *Lilium longiflorum* will be described, and, in a subsequent paper, the submicroscopic structure of the spindle will be discussed in the light of these observations made with the improved polarization microscope.

### 1. The Structure of the spindle in the oöcyte of *Chaetopterus pergamentaceus*.

SCHRADER (1944, p. 7) proposes that spindle fibers be separated into the following three categories:

1. "Continuous fiber": fiber connecting the two centers or poles.
2. "Chromosomal fiber" (or half spindle component): fiber connected with the kinetochore of the chromosome. It may or may not extend to a pole or a center.
3. "Interzonal connection": connection between the separating chromosomes in anaphase and telophase.

When parapodia are cut from a female *Chaetopterus*, the eggs are shed. Thereafter the first maturation division spindle forms in about 15 minutes at 25° C. The spindle proceeds to metaphase and stays in

this stage for several hours unless the egg is further activated (MEAD 1898, INOUÉ 1952c).

The metaphase spindle is attached at the animal pole of the egg, perpendicular to the egg's surface, and under ordinary light this region appears as an empty homogeneous space from which the granules have been expelled.

Under polarized light, the outer pole of the spindle can be seen by its birefringence when the egg is slightly compressed. However, since the granules in the *Chaetopterus* egg are highly birefringent and scatter light very strongly, the complete spindle can not be observed without greatly compressing the egg.

In order to acquire a full view of the spindle without too great a compression, the egg is centrifuged at 15,000 g for 15 minutes between sea-water and isotonic (1.1 M) sucrose. Clear quarters of the eggs which include the spindle and few yolk granules are isolated and washed in fresh sea-water. These quarters develop at least to swimming blastulae following fertilization (HARVEY 1939, INOUÉ 1952c).

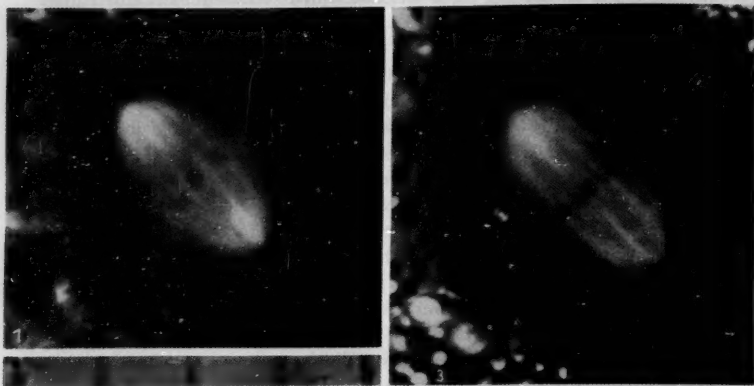
Fig. 1 is a photograph of the spindle in a quarter egg prepared in this fashion. By comparison with the spindle in the whole egg, it can be demonstrated that the structure of the spindle shown in Fig. 1 is not different from the structure of the spindle in the egg before centrifugation.

In Fig. 1, a longitudinal fibrous arrangement is demonstrated in the birefringent spindle (compare with Fig. 2). Those parts which appear bright and are parallel to the spindle axis, and those parts of the astral rays which are dark and lie perpendicular to the axis, are both positively birefringent. Whether they are bright or dark merely depends on the optical quadrants in which the spindle components lie. (See INOUÉ and DAN 1951, and BENNETT 1950.)

The chromosomes also show in the figure, but this is not due to the birefringence of the chromosomes themselves. The chromosomes are much more weakly birefringent than the spindle, appearing a dull gray similar to the background of the field, and standing in strong contrast to the brightly shining spindle fibers.

By compressing the centrifuged egg it is possible to find out to which kind of spindle fiber these longitudinal structures correspond. As the egg is compressed the spindle length increases and the birefringent area becomes more and more clearly differentiated (Figs. 3 and 4) as the birefringence of the fibers increases (INOUE 1952c). By properly adjusting the compensator angle it is possible to demonstrate how some of the birefringent fibers run from the poles to the chromosomes and end abruptly at the chromosomes (Figs. 5 and 6). By definition, then, these are chromosomal fibers.

These chromosomal fibers are not abnormal structures caused by the compression of the eggs. This is demonstrated by the fact that just prior to the onset of, and during, anaphase, exactly the same fibers



Figs. 1-3.

Fig. 1<sup>1</sup>. First maturation division spindle in a living oöcyte of *Charlopterus pergametaceus*. The bright chromosomal and continuous fibers and the dark astral rays are all positively birefringent. Notice convergence of the birefringent fibers at the poles. Chromosomes which are but weakly birefringent appear as dark grey bodies at the equatorial plate. (Compare with Figs. 2 and 9.) Scale  $10\mu$ , for all figures except Figs. 2 and 13.

Fig. 2. Trace of Fig. 1. An image of the negative was projected and the birefringent fibers and chromosomes traced.

Fig. 3. Similar to Fig. 1, but the spindle is slightly stretched by compression of the egg. Individual chromosomal fibers and astral rays appear clearer than in Fig. 1.

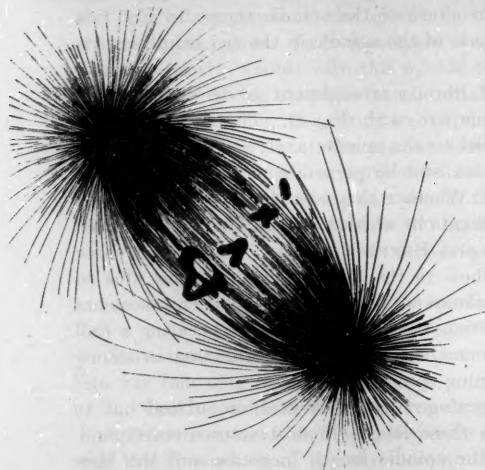
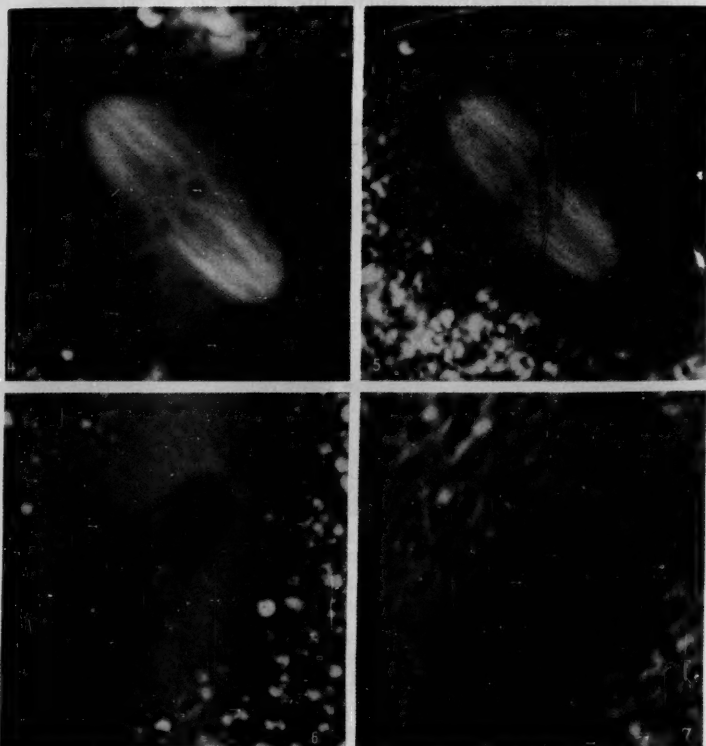


Fig. 2.

<sup>1</sup> Photographic Data: Polarizer and analyzer (special Glan-Thompson prisms) are crossed; compensator set for ca.  $3m\mu$  background retardation; objective, B. & L. strain-free coated achromatic lens  $43\times$ , N.A. 0.84; condensor, B. & L. strainfree coated achromat  $21\times$ , N.A. 0.50 stopped to 0.35; light source, A-H 6 mercury arc lamp with Wratten No 58 green filter; film, Kodak Panatomic-X 35 mm.



show up by their stronger birefringence in eggs which were less compressed (Fig. 7). It should also be remarked that such chromosomal fibers may be observed in spermatocytes of various grasshoppers (*Chortophaga*, *Melanoplus*, *Dissosteira*), and of *Drosophila melanogaster*,



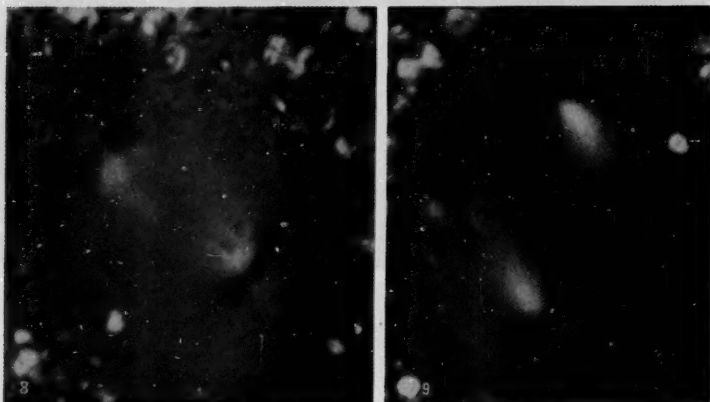
Figs. 4—7. Fig. 4. Spindle stretched even further than in Fig. 3. The large dark particle with a halo (second particle from right on the spindle equator) is not a chromosome. — Fig. 5. Compensator rotated to show the attachment of individual chromosomal fibers to chromosomes in *Chaetopterus* oöcyte. — Fig. 6. Same as Fig. 5 but compensator turned. — Fig. 7. Chromosomal fibers appearing at onset of anaphase after activation of *Chaetopterus* egg.

which have not been centrifuged or compressed, while actively dividing in Ringer's solution.

Therefore, at least part of the longitudinal birefringent structures in the metaphase spindle of an uncompressed egg (Fig. 1) represents the chromosomal fibers.

In Fig. 1 it is also clear that, aside from the birefringent element between the poles and the chromosomes, there are fibers with run by the chromosomes and seem to connect the two poles. The existence of such continuous fibers and other half spindle fibers can be demonstrated more clearly in the anaphase spindle after activation of the egg.

As the chromosomes move closer to the poles, certain birefringent fibers may be seen to lie by the chromosomes with their ends extending farther towards the equator of the spindle (Fig. 8). These fibers have



Figs. 8 and 9. Fig. 8. Anaphase of first maturation division in *Chaetopterus* oocyte. Chromosomal fibers show between chromosomes and poles. Also continuous fibers can be seen in the central spindle region. — Fig. 9. Metaphase in *Chaetopterus* oocyte. Spindle axis lies parallel to polarizer axis. Compare with Figs. 1 and 2. Notice fibrillar appearance of half spindle fibers and gradual transition from spindle fibrils to astral rays.

not only been seen in the anaphase spindle of *Chaetopterus* but also in all of the animal and plant cell spindles in anaphase that I have studied. Some of these fibers run from pole to pole, clearly being continuous fibers, while others seem to thin out and fade away before they reach the equator of the spindle.

The chromosomal fibers lose part of their birefringence during anaphase, but in relation to the other components of the spindle, they still maintain a stronger birefringence, and their identity is not completely lost even at a very late stage in anaphase (Fig. 8).

The spindle in the living *Chaetopterus* egg is thus composed of at least two different types of birefringent fibers. (See INOUÉ 1952c for the effect of colchicine on the various components of the spindle.) In addition, observations of the spindle in different positions (Fig. 9) indicate that the spindle fibers are actually composed of fibrils whose

diameters lie close to the limit of resolution (estimated in the present system to be ca.  $0.3\mu$ ). In Fig. 9, the stage of the microscope was rotated so that the long axis of the spindle coincided with the axis of the polarizer. Hence, fibrils or fibers whose axes lie in the quadrants, including the axes of the spindles shown in Figs. 1, 3, 4 etc., appear brighter than the background; while the fibrils in the other quadrants, including the spindle axis in Figs. 6 and 7, appear darker.

The existence of fibrils as components of spindle fibers was demonstrated in fixed material by SCHRAEDER (1932). SWANN (1952a), from his birefringence studies on sea-urchin eggs, also suggests that the spindle and astral rays are composed of thin radiating fibrils which, however, he was unable to resolve under his microscope.

No difference in structure could be found between these fibrils and the astral rays, with which they appeared to merge without any distinct separation. Both spindle fibrils and astral rays converge to a very small area at the poles of the spindle.

When the structure of the spindle in the living cell, as studied by polarized light, is compared with some of the better figures obtained by fixation and staining, it becomes clear that some fixed preparations can preserve the configuration of structures in the living spindle quite faithfully (at least at the microscopic level).

For instance, MEAD (1898) published some figures drawn from sections of the egg of the same animal *Chaetopterus pergamentaceus* (also collected at Woods Hole), stained with Heidenhain's iron-alum haematoxylin and orange G after fixation in Boveri's picro-acetic mixture. The resemblance of these figures to the photographs of the living spindle is truly remarkable.

If one seeks for some slight difference, MEAD's figures do not actually correspond to the photographs of the spindle in the uncompressed or very slightly compressed eggs (Figs. 1, 2, 9) but resemble more closely in structure and configuration the spindles in the highly compressed eggs (Figs. 4, 5, 6). When we consider the fact that the fixatives used by MEAD almost certainly make the spindle fibers contract, it is understandable why his figures have a closer resemblance to the structure of the spindle under tension. The very fact that in both the fixed spindle and the stretched living spindle the fibers take a straighter course and the round contours at the poles of the spindles are lost argues strongly in favor of this explanation.

The demonstration of spindle fibers in living cells by means of a polarization microscope, and the very close resemblance of the structure of living spindles to figures obtained from good fixed and stained preparations, give final proof for the reality of spindle fibers in living cells. Moreover, this shows that the cytological configurations in well

fixed and stained preparations can very closely resemble cellular structures in their living form. This point has already been emphasized by BĚLAŘ (1928, 1929a) for cellular organelles other than spindles.

## 2. The spindle in the pollen mother cell of *Lilium longiflorum*.

As an example of the structure of the spindle in a dividing plant cell, observation, under polarized light, of the dividing pollen mother cell of the Easter lily will be described. The following description of *Lilium* mitosis is based not only upon direct observations and still photographic records but also upon a time lapse motion picture of the two successive meiotic divisions taken through the new polarization microscope at a rate of 4 frames per second.

The pollen mother cells of the lily also contain strongly birefringent granules (fat droplets) which can be removed by very mild centrifugation. All of the observations were made in a modified Ringer's solution (isotonic lactose substituted for glucose, or no sugar added at all) on the first and second meiotic mitoses in cells which had been centrifuged for 3 minutes at 1800 g.

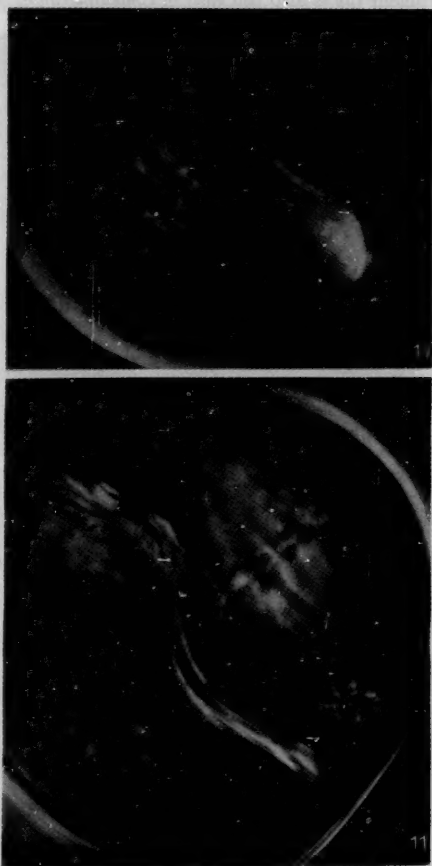
The structure of the spindle after centrifugation can be considered to be quite normal since centrifuged cells are found to go through the two consecutive meiotic divisions without demonstrable abnormality. Supplementary observations were also made on both uncentrifuged and centrifuged pollen mother cells of *Polygonatum biflorum* and *Gasteria carinata* as well as with a species of *Iris*. The structure of the spindles of all these forms was similar at all stages of division, except for a difference at telophase depending on the sequence in cell plate formation.

As Fig. 10 shows, the spindle of the *Lilium* pollen mother cell under the polarization microscope shows a very striking longitudinal striation. The spindle in the figure is in early metaphase II, and the spindle poles do not show the kind of convergence found in the spindle of many animal cells. This type of apolar or multipolar spindle has been shown in plant cells by OSTERHOUT (1897) and by MOTTEIR (1897), in insect spermatocytes by HUGHES-SCHRADER (1948), and in the blastomeres of a mite by COOPER (1939).

In early metaphase (both I and II) the birefringence is strongest near the equatorial plate, and the birefringent streaks spread and become wider towards the 'poles' of the spindle. These streaks do not appear to be interrupted by the chromosomes at the equatorial plate.

By carefully focussing the spindle in side view and by observing the polar view of the spindle, it can be shown that the birefringent streaks are actually not fibers at this stage. Instead all of the plant spindles observed at early metaphase I or II are composed of sheet-like aggregations of fibrils that are oriented parallel to the spindle axis.

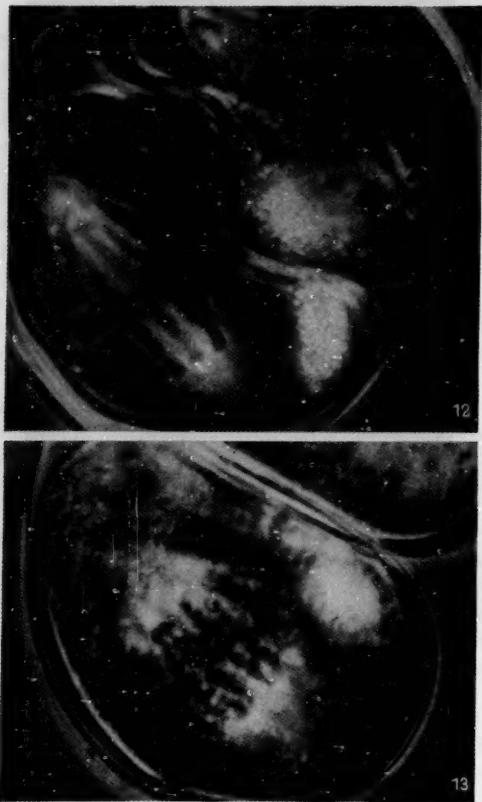
In cross section these sheets of fibrils appear to lie parallel to the arms of the chromosomes.



Figs. 10 and 11. Fig. 10. Second meiotic division in pollen mother cell (PMC) of *Lilium longiflorum*. Early metaphase. Sheet-like aggregate of fibrils look like spindle fibers in side view. Birefringent granules have been displaced and packed in one corner (lower right) by centrifugation. — Fig. 11. Later metaphase of *Lilium* PMC. The left cell shows oblique cross sections of birefringent chromosomal fibers. The right cell shows beginning of convergence of the spindle poles.

As anaphase approaches, the spindle poles gradually converge and the birefringence also becomes more uniformly distributed along the whole length of the spindle (Fig. 11, the right cell).

Just before the separation of the chromosomes, the regions of the spindle adjacent to the kinetochores of the chromosomes become strongly birefringent (as is also the case in *Chaetopterus* eggs and insect



Figs. 12 and 13. Fig. 12. Anaphase of *Lilium* PMC. Birefringence is strongest in half spindle, especially adjacent to the kinetochores of the chromosomes. The central spindle region is very weakly birefringent. — Fig. 13. Anaphase of first meiotic division in *Lilium* PMC. Chromosomal fibers show very strong birefringence adjacent to kinetochores. Drawn out helices are obvious in chromosomes. Magnification lower than in other figures. Clarity of the spindle structure in this figure is due to improvement in photographic technique and does not distinguish 1st meiotic division from 2nd.

spermatocytes) and disclose the existence of strongly birefringent chromosomal fibers. As can be seen in the left cell in Fig. 11, optical sections of individual chromosomal fibers are visible when a polar



view of the spindle is observed at this stage. Thus, the longitudinal striation of the late metaphase and anaphase spindles, unlike that of early metaphase, actually represents chromosomal fibers and not cross-sections of sheet-like material.

In anaphase the strongly birefringent region of the half spindles (the chromosomal fibers plus part of the continuous fibers) shifts toward the spindle poles while the poles themselves gradually move apart from each other (Fig. 12). The chromosomal fibers, especially near the kinetochores, maintain their strongest birefringence until a very late stage in anaphase, as is clearly demonstrated in Fig. 13.

At this stage helices in each of the separating chromosomes can be seen, first their gyres drawing apart as the chromosomes are stretched by the chromosomal fibers (Fig. 13), then finally recoiling, presumably after the interzonal connections between the separating chromosome pairs have broken.

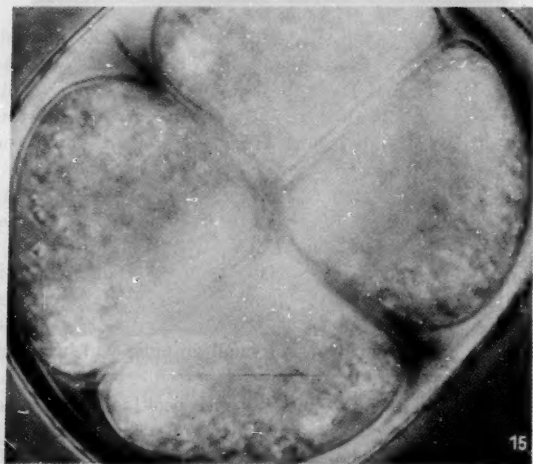
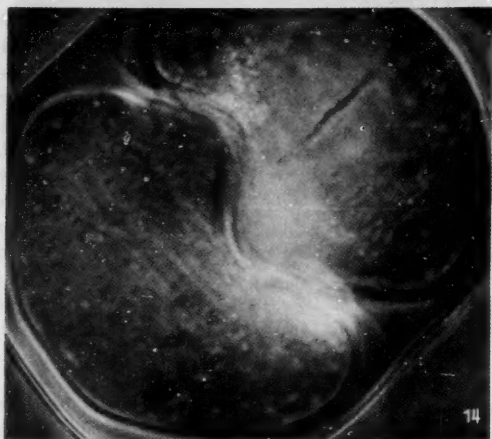
During anaphase, just as in the case of the *Chaetopterus* egg, the birefringent fibers exist not only between the chromosome kinetochores and the spindle poles, but also some fibers (or fibrils) extend out farther than the tail ends of the chromosomes (Fig. 12). Some of these fibers do not appear to run much farther than the ends of the chromosomes, while others run clear through the nearly isotropic gap between the separating half spindles.

This "gap" between the separating chromosomes has been described by SCHMIDT (1936, 1939) as isotropic, and by SWANN (1951 a, b) as weakly birefringent. INOUE and DAN (1951) found weakly birefringent strands here but were unable to determine to which component of the spindle these birefringent strands belong. It now seems clear that continuous fibers mainly contribute to the birefringence on this region.

In telophase the continuous fibers regain their strong positive birefringence, and numerous fibers connecting the two daughter nuclei can be observed (Fig. 14, the left cell). The birefringence of these fibers continues to increase, especially around the old equatorial plate, and finally the fibers form the phragmoplast. Very shortly after the phragmoplast is completed, the cell plate forms in the middle of the phragmoplast by a rapid fusion of small granules which collect in that region (Fig. 14, the right cell).

The new cell plate has a birefringence positive with respect to the plane in which it lies, and consequently appears darker than the birefringent phragmoplast whose sign is positive relative to the long axis of the spindle. As the new cell wall develops the daughter nuclei move closer together, perhaps because of a pulling action of the remaining continuous fibers. Fig. 15 shows the completion of the division of the same cells shown in Figs. 12 and 14.

Therefore, in the *Lilium* pollen mother cell, the existence of various fibrous components has been demonstrated in the spindle of living and normally functioning cells, just as in the animal cells described



Figs. 14 and 15. Fig. 14. Telophase of *Lilium* PMC. Continuous fibers between the daughter nuclei become strongly birefringent again (the left cell) and form the phragmoplast (the right cell). The new cell plate is positively birefringent with respect to a plane perpendicular to the spindle axis and appears dark. The birefringent granules have started to disperse. Fig. 15. The same cells shown in Figs. 12 and 14 after completion of the 2nd meiotic division. Birefringent granules have filled the cells again.

above. Furthermore, the resemblance of the fixed and stained figure with the structure of the spindle observed under polarized light is again quite remarkable (for instance see MOTTIER 1897), although the similarity is not quite so good as in the case of the *Chaetopterus* egg.

### Summary.

1. With an improved polarization microscope, spindle fibers and fibrils, can be seen in living, normally dividing cells.

2. Chromosomal and continuous fibers are demonstrated in photographs of oöcytes of *Chaetopterus pergamentaceus*, as well as in pollen mother cells of *Lilium longiflorum*.

3. Supplementary observations on spermatocytes of several species of grasshopper and of *Drosophila melanogaster*, as well as on pollen mother cells of *Polygonatum biflorum*, *Gasteria carinata* and a species of *Iris*, confirm the findings mentioned above.

4. Some of the structural changes observed in the spindle and chromosomes during division are described.

5. The appearance of spindle structures in certain fixed preparations closely resembles structures observable in living cells under polarized light.

### Literature.

- BÉLAËR, K.: Über die Naturtreue des fixierten Präparats. Z. Vererbungslehre Suppl. 1, 402—406 (1928). — Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. II. Untersuchungen an den Spermatocyten von *Chorthippus (Stenobothrus) lineatus* PANZ. Roux' Arch. 118, 359—484 (1929a). — Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. III. Untersuchungen an den Staubfadenhaarzellen und Blattmeristemzellen von *Tradescantia virginica*. Z. Zellforsch. 10, 73—134 (1929b). — BENNETT, H. S.: The microscopical investigation of biological material with polarized light. In McCLEUNG'S Handbook of Microscopical Technique, 3. ed., p. 591—677. 1950. — CARLSON, J. G.: Microdissection studies of the dividing neuroblast of the grasshopper *Chorthippa viridifasciata* (DE GEER). Chromosoma 5, 199—220 (1952). — CLEVELAND, L. R.: Origin and development of the achromatic figure. Biol. Bull. 74, 41—55 (1938). — CONKLIN, E. G.: Effects of centrifugal force on the structure and development of the eggs of *Crepidula*. J. of Exper. Zool. 22, 311—419 (1917). — COOPER, K. W.: The nuclear cytology of the grass mite, *Pediculopsis graminum* (REUT.), with special reference to karyomerokinesis. Chromosoma 1, 54—103 (1939). — Visibility of the primary spindle fibers and the course of mitosis in the living blastomeres of the mite *Pediculopsis graminum* REUT. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 27, 480—484 (1941). — CORNMAN, I.: A summary of evidence in favour of the traction fiber in mitosis. Amer. Naturalist 78, 410—422 (1944). — HARVEY, E. B.: Development of half eggs of *Chaetopterus pergamentaceus* with special reference to parthenogenetic merogony. Biol. Bull. 76, 384—404 (1939). — HUGHES, A. F., and M. M. SWANN: Anaphase movements in the living cell. A study with phase contrast and polarized light on chick tissue cultures. J. of Exper. Biol. 25, 45—70 (1948). — HUGHES-SCHRADER, SALLY: Cytology of coccids (*Coccioidea-Homoptera*). Adv. Genet. 2, 127—203 (1948). — IXOÛÉ, S.: Studies on depolarization of light at microscope lens surfaces. I. The origin of stray light

by rotation at the lens surfaces. *Exper. Cell Res.* **3**, 199—208 (1952a). — Improvements of the Polarization Microscope for Biological Purposes. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **71**, 311—312 (1952b). — The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. *Exper. Cell Res. Suppl.* **2**, 305—318 (1952c). — INOUÉ, S., and K. DAN: Birefringence of the dividing cell. *J. of Morph.* **89**, 423—455 (1951). — MEAD, A. D.: The origin and behavior of the centrosomes in the annelid egg. *J. of Morph.* **14**, 181—218 (1898). — MORGAN, T. H.: Cytological studies of centrifuged eggs. *J. of exper. Zool.* **9**, 593—656 (1910). — MOTTIER, D. M.: Beiträge zur Kenntnis der Kernteilung in den Pollenmutterzellen einiger Dikotylen und Monokotylen. *Jb. wiss. Bot.* **30**, 169—204 (1897). — OSTERHOUT, W. J. V.: Über Entstehung der karyokinetischen Spindel bei *Equisetum*. *Jb. wiss. Bot.* **30**, 159—168 (1897). — SCHMIDT, W. J.: Kernspindel und Chromosomen im lebenden, sich furchenden Ei von *Psammechinus miliaris* (MÜLL.). *Ber. oberhess. Ges. Naturheilk.* **17**, 140 (1936). — Doppelbrechung der Kernspindel und Zugfasertheorie der Chromosomenbewegung. *Chromosoma* **1**, 253—264 (1939). — Die Doppelbrechung des Protoplasmas und ihre Bedeutung für die Erforschung seines submikroskopischen Baues. *Erg. Physiol.* **44**, 27—95 (1941). — SCHRADER, F.: Recent hypotheses on the structure of spindles in the light of certain observations in *Hemiptera*. *Z. Zool.* **142**, 520—539 (1932). — On the reality of spindle fibers. *Biol. Bull.* **67**, 519—533 (1934). — Mitosis. The movements of chromosomes in cell division. Columbia University Press 1944. — SHIMAMURA, T.: Studies on the effect of the centrifugal force upon nuclear division. *Cytologia* **11**, 186—216 (1940). — SWANN, M. M.: Protoplasmic structure and mitosis. I. The birefringence of the metaphase spindle and asters of the living sea-urchin egg. *J. of Exper. Biol.* **28**, 417—433 (1951a). — Protoplasmic structure and mitosis. II. The nature and cause of birefringence changes in the sea-urchin egg at anaphase. *J. of Exper. Biol.* **28**, 434—444 (1951b). — WADA, B.: Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. II. Das Verhalten der Spindelfigur und einige ihrer physikalischen Eigenschaften in den somatischen Zellen. *Cytologia* **6**, 381—406 (1935). — The mechanism of mitosis based on studies of the submicroscopic structure and of the living state of the *Tradescantia* cell. *Cytologia* **16**, 1—26 (1950).

Dr. SHINYA INOUÉ, Department of Anatomy,  
School of Medicine, University of Washington,  
Seattle 5, Washington, USA.

Aus dem Institut für allgemeine Biologie der Universität Wien.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PAARUNGS-AFFINITÄT BEI RIESENCHROMOSOMEN.

Von

ELFRIEDE KUNZE.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Juni/20. Oktober 1952.)

Es ist bekannt, daß die Paarungsaffinität in den Riesenchromosomen mancher Dipteren gewissen Schwankungen unterworfen ist. Die dadurch auftretenden Paarungslücken sind mehr oder weniger häufig, doch ist bisher noch kaum untersucht worden, wodurch dieses Phänomen bedingt ist. Es war daher zunächst eine statistische Untersuchung über die Ausdehnung dieser Paarungslücken durchzuführen, um so prüfen zu können, ob und in welcher Weise Zusammenhänge zwischen dem sichtbaren Chromosomenbau und der Paarungsaffinität bestehen.

Zu diesen Untersuchungen eignen sich vorzüglich die Riesenchromosomen von *Simulium* und von *Bibio*. Von der Gattung *Simulium* wählte ich eine Art, die besonders kontrastreich strukturierte Riesenchromosomen mit äußerst klarer Ausprägung der Querscheiben besitzt.

Die Identifizierung dieser Art kann erst bei späteren Untersuchungen durchgeführt werden. Die Larven wurden in kalten, stark fließenden Bächen des Lunzer Gebietes (Niederösterreich) im Mai der Jahre 1949 und 1951 gefangen. Sie sind gegen Sauerstoffmangel äußerst empfindlich, ihre Aufzucht in der Gefangenschaft ist daher sehr schwer durchzuführen und die Präparation muß bald nach dem Fang erfolgen.

Die Riesenchromosomen sind in den Speicheldrüsen am klarsten ausgebildet. Die Speicheldrüsen sind lange, sackförmige Gebilde, die einmal geknickt die ganze Länge des Körpers durchziehen. Der distale Teil ist besonders stark erweitert, während der proximale Teil schlauchförmig ist und in den kurzen Ausführungsgang übergeht. Die Kerne, die die am besten ausgebildeten Chromosomen enthalten, liegen im distalen Teil, der aber von einer besonders großen Menge äußerst zähen, klebrigen Sekretes erfüllt ist, das die Herstellung von Dauerpräparaten wesentlich erschwert. Bei der Fixierung in Essigsäure koaguliert dieses Sekret nämlich zu einer festen, elastischen Masse, durch welche das Deckglas festgeklebt wird und beim Abheben vor dem Einschließen des Präparates leicht zerbrochen werden kann. Um dies zu vermeiden, kann man vorher durch Anstechen der Drüse das Sekret ausfließen lassen oder man präpariert die Wand der Speicheldrüse vor dem Auflegen des Deckglases von der erstarrten Sekretmasse ab. Es wurde mit Essigorcein (2% Orcein in 60% Essigsäure) etwa 10 min lang gefärbt; eingeschlossen wurden die Präparate in Euparal.

Der Riesenchromosomensatz der von mir untersuchten Spezies besteht aus 3 Chromosomenpaaren, die alle metazentrisch sind und mit

ihren Spindelfaseransatzstellen in einem Chromozentrum vereinigt sind (Abb. 1). Es sind keine auffallenden Heterochromatinmassen vorhanden und auch keine balbianiringähnlichen Strukturen zu sehen. Im Verlauf aller 6 Elemente treten häufig Paarungslücken auf. Ein langes Element bildet mit dem kürzesten das I. Chromosom. Das II. Chromosom setzt sich ebenfalls aus einem langen und einem kürzeren Schenkel zusammen, wogegen das III. Chromosom annähernd isobrachial ist und aus den

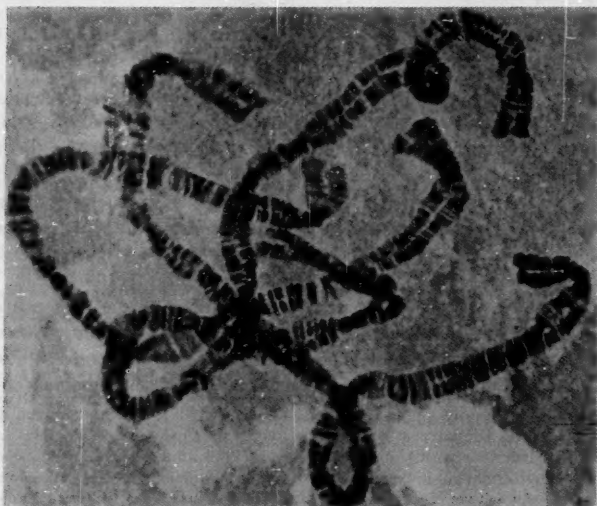


Abb. 1. Ganzer Chromosomensatz von *Simulium* sp. Vergr. 700mal.

beiden längsten Elementen besteht. Einer der langen Schenkel des III. Chromosoms trägt nahe dem Chromozentrum den Nukleolusbildner. Da der Nukleolus kaum färbbar ist, konnte er nur in wenigen Kernen undeutlich gesehen werden. An dieser Stelle ist das Chromosom meist ungepaart und leicht gezerzt, da die haploiden Stränge durch das Wachstum des Nukleolus auseinandergedrängt werden. Es waren in mehreren Fällen zarte fadenförmige Einstrahlungen des Chromosoms in den Nukleolus zu sehen, jedoch war das Chromosom an dieser Stelle meist auseinandergerissen. Die klaren Kernverhältnisse dieser Art versprachen eine befriedigende Beantwortung der Paarungslückenfrage.

Zum Vergleich wurden die im allgemeinen stärker gepaarten Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von *Bibio marci* L. in derselben Weise untersucht.



Die Larven dieser Fliege leben unter verrottetem Laub, meist am Grunde alter Buchenstämme, und ihre Präparation ist gegenüber *Simulium* wesentlich erleichtert, da das Sekret kein Präparationshindernis darstellt.

Auf Grund der in den Gonaden der Larven gut zu untersuchenden Mitosen besteht der Chromosomensatz dieser Art wie bei *Bibio hortulanus* (HEITZ und BAUER) aus 5 metazentrischen Chromosomenpaaren, von denen das längste annähernd isobrachial ist, während die übrigen 4 heterobrachial sind. Auch der Riesenchromosomensatz zeigt, daß die 4 heterobrachialen Chromosomen aus je einem längeren und einem kürzeren Schenkel zusammengesetzt sind, wogegen das längste Chromosom einheitlich erscheint und nur selten mit den anderen Chromosomen zusammenhängt. Die Lage der Spindelfaseransatzstelle konnte ich bei diesem Chromosom nicht mit Sicherheit feststellen. Eines der beiden kürzesten Elemente zeigt am proximalen Ende feine Einstrahlungen in den deutlich sichtbaren Nukleolus. Auch diese Art, die in ihren Riesenchromosomen trotz Ausbildung breiter Dublettenscheiben eine sehr klare Scheibenfolge aufweist, eignete sich sehr gut für die statistische Bearbeitung.

Chromosomenkarten wurden von *Simulium* sp. für 2 der 3 langen Chromosomen, von *Bibio marci* für alle 5 Chromosomen entworfen. Die statistische Auswertung der Befunde über die Paarungslücken wurde an Hand dieser Chromosomenkarten in folgender Weise durchgeführt:

Von *Simulium* sp. wurden in einem Präparat 60 verschiedene Kerne genau überprüft und die gepaarten Stellen an den betreffenden Chromosomen eingetragen; jedes der 2 kartierten Chromosomen wurde also 60mal auf die Verteilung und den Umfang der gepaarten Zonen hin geprüft. Bei *Bibio marci*, die wesentlich weniger Kerne in einer Speicheldrüse aufweist, wurden aus 6 Präparaten von je 10 Kernen alle Chromosomen ebenso analysiert.

Somit wurde also bei beiden Arten jedes kartierte Chromosom 60mal auf Paarungslücken statistisch untersucht. Nach Abschluß dieser Eintragungen konnte ich für jede einzelne Stelle jedes Chromosoms durch Zählung angeben, wie viele Male sie ungepaart war. Es wurde dann zu jedem Chromosom eine Treppenkurve gezeichnet (Abb. 2 und 3), wobei 60 bedeutet, daß diese Stelle in allen 60 beobachteten Fällen gepaart war, 0 dagegen, daß in allen 60 Fällen eine Paarungslücke auftrat. Nicht berücksichtigt sind bei dieser Darstellung Paarungslücken, die innerhalb der haploiden Stränge auftreten und gelegentlich an verschiedenen Stellen der Chromosomen beobachtet wurden. Sie erstrecken sich in der Regel nur auf einige wenige Scheiben und stellen sich so dar, daß ein oder mehrere Chromonemen von dem Bündel abgetrennt verlaufen. Diese Erscheinung wurde schon von GEITLER (1934) für *Simulium* erwähnt. Es ist aus der graphischen Darstellung der als Beispiele gewählten Chromosomen II von *Simulium* und C von

*Bibio* leicht zu ersehen, daß die Chromosomen von *Simulium* sp. im allgemeinen viel schwächer gepaart sind als die von *Bibio marci*. Auch

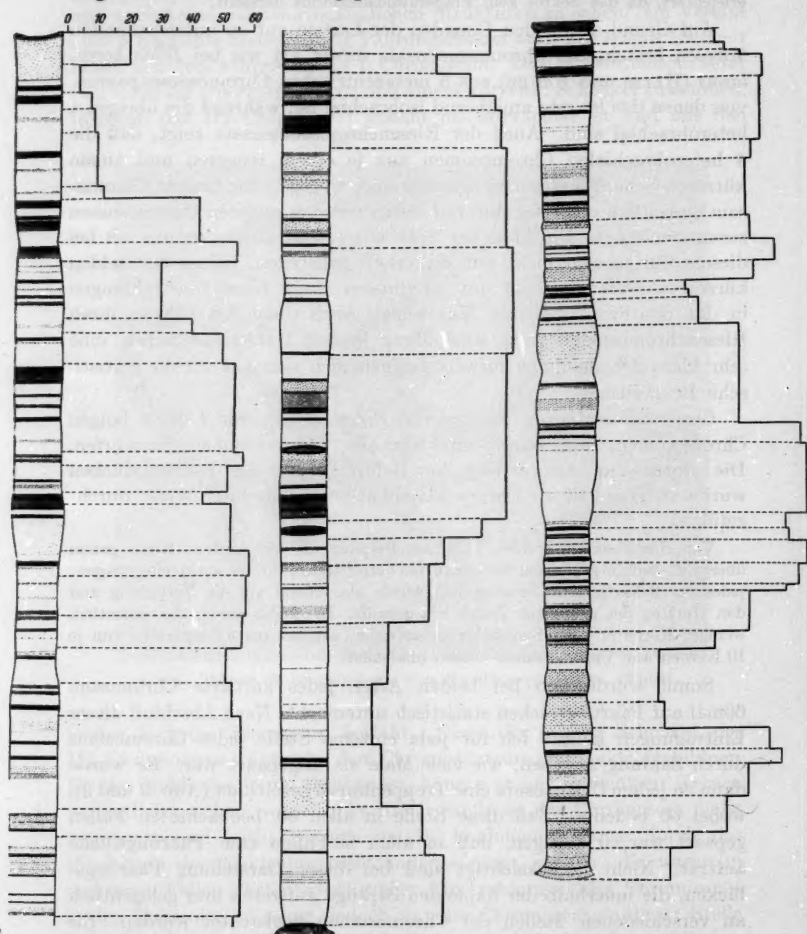


Abb. 2. Karte des Chromosoms II von *Simulium* sp. (in 3 Teile zerlegt) und Treppendiagramm der Paarungshäufigkeit. Die Maßeinheiten 0—60 bezeichnen die Zahl der Paarungen in 60 Kernen.

ist sofort augenfällig, daß gewisse Strecken immer gepaart waren, andere dagegen mehr oder weniger häufig Paarungslücken zeigten.

Es ist also die Paarungsaffinität aperiodisch entlang dem Chromosom in ihrer Stärke verschieden. Sehr kurze Elemente zeigen meist keine Paarungslücken. Zusammenhänge zwischen der sichtbaren Chromosomenstruktur und den Schwankungen der Paarungsaffinität waren dabei nicht festzustellen.

Um dies statistisch zu beweisen, führte ich folgende Berechnungen durch:

Die Längen, über welche sich ein bestimmter Paarungsgrad im Verlaufe eines Chromosoms erstreckt, wurden zusammengefaßt und die in diesen Abschnitten befindlichen Scheiben gezählt. Die Scheibenanzahl, durch die Summe der betreffenden Längen dividiert, ergab einen Scheibenindex. In der letzten Zeile jeder der folgenden Tabellen ist die Gesamtlänge des betreffenden Chromosoms, die Anzahl aller darin enthaltenen Scheiben und der daraus berechnete Scheibenindex angegeben. Diese Berechnung wurde in der gleichen Art für jedes kartierte Chromosom durchgeführt sowie für den ganzen Chromosomensatz von *Bibio marci*. Hier sind nur die Daten für die als Beispiele abgebildeten beiden Chromosomen wiedergegeben (Tabelle 1 und 2).

Würden Zusammenhänge zwischen Paarungsaffinität und der Scheibendichte bestehen, so müßte in den Tabellen ein regelmäßiges Ansteigen oder Absinken der Scheibenindizes mit den Paarungswerten erfolgen. Oder es müßte eine in jedem Chromosom gleichbleibende periodische Veränderung der Indizes mit der aufsteigenden Reihe der Paarungskategorien klar ersichtlich sein. Dies ist aber nicht der Fall. Es hat also die Paarungsaffinität offenbar nichts mit der Scheibendichte zu tun, sondern muß in der Längsstruktur des Chromosoms anders begründet sein.

Um festzustellen, ob Zusammenhänge zwischen der Paarungsaffinität und der Entfernung vom Chromozentrum oder vom Chromosomenende bestehen, wurde eine diesbezügliche Berechnung durchgeführt.

Die Länge der Abschnitte, in die jedes Chromosom eingeteilt wurde, habe ich so gewählt, daß das kürzeste Element (der kurze Schenkel des Chromosoms B

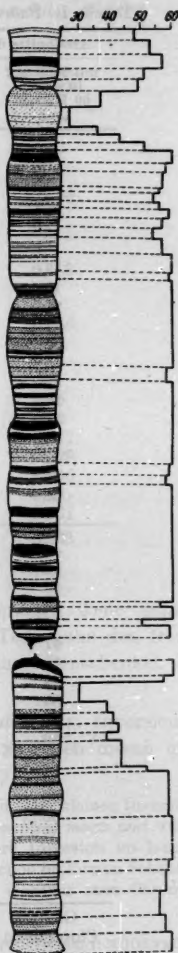


Abb. 3. Karte des Chromosoms C von *Bibio marci*. Das Treppendiagramm gibt die Paarungshäufigkeit der Abschnitte an. Maßstab wie bei Abb. 2, aber aus Raumersparungsgründen erst bei 25 beginnend.

Tabelle 1. Paarungsverhalten des Chromosoms II von *Simulium* sp.

Abschnitte des Chromosoms		Anzahl der Scheiben  N	Scheiben- index  L/N
mit Paarung in n von 60 Kernen n =	Länge in cm der Chromo- somenkarte L		
4	1,8	2	0,9
5	3,8	5	0,76
8	5,0	5	1
9	1,5	1	1,5
10	7,2	6	1,2
12	4,0	6	0,66
14	1,7	2	0,85
16	2,2	5	0,44
20	2,1	3	0,7
21	2,9	5	0,58
22	1,4	2	0,7
23	5,6	8	0,7
25	1,7	5	0,34
28	6,1	8	0,762
30	1,1	3	0,966
31	3,7	6	0,616
32	2,1	4	0,524
34	2,3	7	0,326
35	0,5	2	0,25
38	5,9	10	0,59
40	1,5	3	0,5
41	9,1	24	0,383
42	1,6	4	0,4
43	6,5	12	0,541
45	0,8	2	0,4
46	4,0	4	1
47	1,4	3	0,466
48	4,1	6	0,685
49	1,6	4	0,4
50	1,4	5	0,28
51	2,8	3	0,933
52	0,9	2	0,45
53	9,4	15	0,626
54	3,9	5	0,78
55	23,2	30	0,773
56	0,8	0	—
57	8,7	12	0,675
58	15,0	18	0,833
59	2,5	3	0,833
60	7,7	10	0,77
Ganzes Chromosom	169,3	260	0,651

von *Bibio*) 2 Teile umfaßte, einen chromozentrumnahen und einen freien Endteil. Diese Abschnittslänge wurde an jedem Chromosom vom Chromozentrum ausgehend nach beiden Seiten aufgetragen. Für das Chromosom E von *Bibio* wurde die geometrische Mitte als Ausgangspunkt dieser Einteilung gewählt, da bei diesem Chromosom die Spindelfaseransatzstelle nicht festgestellt werden konnte. Für jeden der Abschnitte wurde sodann der Mittelwert der in den Teilabschnitten festgestellten Paarungshäufigkeiten berechnet.

Tabelle 2. Paarungsverhalten des Chromosoms C von *Bibio marci*.

Abschnitte des Chromosoms		Anzahl der Scheiben  N	Scheiben- index  L/N
mit Paarung in n von 60 Kernen  n =	Länge in cm der Chromo- somenkarte  L		
27	1,3	2	0,65
30	1,2	2	0,6
36	0,5	3	0,166
37	1,0	4	0,25
39	1,2	3	0,4
41	0,6	3	0,2
43	1,1	6	0,183
44	1,6	2	0,8
48	0,8	2	0,4
49	0,8	3	0,266
50	0,4	1	0,4
51	1,2	5	0,24
52	0,3	1	0,3
53	0,9	2	0,45
54	1,3	5	0,26
56	2,5	9	0,277
57	3,9	17	0,229
58	4,5	19	0,236
59	6,1	21	0,29
60	26,5	80	0,331
Ganzes Chromosom	57,7	190	0,303

Daraus ergab sich, daß die chromozentrumnahen Teile einmal schwächer, einmal stärker gepaart sind als die Teile nahe den freien Enden oder die Abschnitte in der Mitte der Chromosomenschenkel. Es ließ sich keinerlei Regelmäßigkeit feststellen.

Da sowohl bei *Bibio marci* als auch bei *Simulium* sp. Inversionen auftreten, war zu untersuchen, ob Beziehungen zwischen diesen und der Paarungsaffinität bestehen.

Bei *Simulium* sp. fand ich unter 10 Präparaten eines mit einer kleinen Inversion in der Mitte des langen Schenkels des I. Chromosoms. Bei *Bibio marci* trat unter 14 Präparaten von einem Standort zweimal eine größere Inversion im langen Schenkel des Chromosoms C und einmal eine kleinere Inversion im kurzen Schenkel des Chromosoms D auf. Beide Inversionen erstrecken sich bis zum Chromozentrum.

Es wäre wichtig gewesen festzustellen, ob die invertierte homozygote Anordnung eine Änderung der Paarungsaffinität gegenüber der nicht invertierten Anordnung aufweist, ob die Paarung also regions- oder lagebedingt ist. Infolge des geringen Prozentsatzes, in dem Inversionen bei beiden Arten auftraten, war in den Präparaten die invertierte homozygote Anordnung nicht vorhanden. Auch zur Prüfung der Frage, ob im heterozygoten Zustand der Inversion innerhalb der Inversions-

schlinge die Paarungsaffinität gegenüber dem einen homozygoten Zustand verändert ist, stand nur ein geringes Material zur Verfügung.

Bei *Simulium* sp. eigneten sich nur 5 Kerne für die Untersuchung. Bei *Bibio* konnten im Falle der Inversion im Chromosom C 31 Kerne, im Falle der Inversion in Chromosom D 17 Kerne überprüft werden. Die Enden der Inversionsschlingen blieben unberücksichtigt, da hier Paarungslücken aus mechanischen Gründen bedingt sind.

Es kann schon nach diesem wegen der Seltenheit der Inversionen geringen Zahlenmaterial ausgesagt werden, daß eine Änderung der Paarungsaffinität innerhalb der Inversionsschlinge nicht eintritt, vielmehr die Verteilung der Paarungslücken mit der der homozygoten Chromosomen übereinstimmt.

Auch an anderen Objekten ist schon aufgefallen, daß die Paarungslücken bevorzugt an bestimmten Chromosomen oder Chromosomenteilen vorkommen.

BAUER (1936) stellte fest, daß bei *Trichotanytus* nur eine lose Umschlingung der Partner ohne jegliche Paarung auftritt, daß das IV. Chromosom von *Chironomus plumosus* häufig fehlende Paarung zeigt, während an den langen Chromosomen dieser Art nur bestimmte Abschnitte oft ungepaart sind und daß bei *Chironomus thummi* nur ausnahmsweise gewisse Paarungslücken auftreten. FIALA und NEUBERT (1952) geben an, daß bei *Drosophila hydei* nur selten Paarungslücken vorkommen; wenn das aber der Fall ist, betreffen sie meist beim Weibchen das X-Chromosom.

Ich beobachtete bei einer *Chironomus*-Art der *Halophilus*-Gruppe ebenfalls, daß bestimmte Abschnitte der 3 langen Chromosomen häufig ungepaart sind, während das IV. Chromosom fast immer ungepaart bleibt. Auch *Eucricotopus trifasciatus* zeigt häufig Paarungslücken, die bestimmte Abschnitte vorwiegend betreffen. Allerdings ist hier das Riesenchromosomenbild wegen der besonders langen, stark verwickelten Elemente, die noch dazu an den Enden meist verklebt sind, zu unklar, um nähere Details feststellen zu können. Die ebenfalls von mir untersuchte *Prodiamesa olivacea* besitzt in ihren 4 Riesenchromosomen einige Paarungslücken, die nicht sehr häufig auftreten, jedoch regelmäßig dieselben Abschnitte betreffen. Besonders beim Nukleoluschromosom strahlen meistens die Enden getrennt in den Nukleolus ein. Das IV. Chromosom scheint konzentrisch gebaut zu sein (BAUER 1936). In diesem Chromosom habe ich niemals Paarungslücken beobachtet.

Es ist bekannt, daß in den verschiedenen Geweben eines Organismus die Paarungsaffinität sehr verschieden stark sein kann. So beobachtete ich in den Riesenchromosomen der MALPIGHISCHEN Gefäße von *Prodiamesa olivacea*, daß große Strecken der Chromosomen ungepaart sind, während die Speicheldrüsen der gleichen Individuen wesentlich weniger Paarungslücken zeigen. Bei *Drosophila*-Arten kommt es vor, daß bestimmte Larven sehr wenige, andere wieder auffallend viele Paarungs-



lücken in ihren Speicheldrüsenchromosomen haben. Es scheint dies auf physiologischen Verschiedenheiten im Zustand der einzelnen Individuen zu beruhen. Wir haben gelegentlich beobachtet, daß bei Infektion einer *Chironomus*-Speicheldrüse mit pathogenen Pilzen die Chromosomen eine wesentlich schwächere Paarungsaffinität gezeigt haben als in den Drüsen gesunder Larven. Nach E. GOLDSCHMIDT (1947) ist in Bastardlarven von Chironomiden die Paarungsaffinität bei extrem hohen und extrem niederen Temperaturen geringer als im optimalen Temperaturbereich. Außerdem war bei diesen Larven in allen Temperaturbereichen eine Zunahme der Paarungsintensität mit steigendem Alter zu beobachten. Nach Untersuchungen von F. MAINX und Mitarbeitern (noch unveröffentlicht) scheint die Paarungsaffinität auch von genischen Faktoren abhängig zu sein. Zu erwähnen wäre in diesem Zusammenhang, daß PÄTAU (1935) bei Untersuchung des Artbastardes *Drosophila melanogaster*  $\times$  *D. simulans* beobachtete, daß die Paarungslücken im Bastard weit häufiger auftreten, als das auf Grund der sichtbaren Verschiedenheit der Struktur gewisser Abschnitte der Fall sein müßte. Es besteht nach PÄTAU die Möglichkeit, daß dieses abnorme Paarungsverhalten im Bastard genisch bedingt ist. Es sei aber auch möglich, daß einige homologe Gene des einen oder anderen Partners in einer anderen Allelform vorliegen und dadurch lokal die schwächere Paarungsaffinität bedingt sei.

Über die Art der Kräfte, die bei der Anziehung zwischen den homologen Chromosomen wirksam sind, kann man sich heute noch keine bestimmtere Vorstellung machen. Bisherige Hypothesen dieser Richtung (FRIEDRICH-FREKSA 1940, DELBRÜCK 1941) weisen darauf hin, daß die physikochemischen Eigenschaften von Eiweißmolekülen, die im Chromosom in bestimmter Weise angeordnet sind, die Ursache für die Paarung darstellen könnten. Daß diese Muster nicht unmittelbar mit dem Scheibenmuster identifiziert werden können, zeigt die vorliegende Arbeit. Es kann nur vermutet werden, daß ein unsichtbares Muster chemischer Art in bestimmter Weise über das Chromosom verteilt ist, das durch seine Eigenschaften den Paarungsgrad bestimmt.

#### Zusammenfassung.

1. Die Paarungsaffinität der Riesenchromosomen vom *Simulium* sp. und von *Bibio marci* ist entlang der Riesenchromosomen sehr verschieden stark ausgeprägt; die Verteilung der Paarungslücken ist keinesfalls zufällig.
2. Die Paarungsaffinität ist nach einer statistischen Prüfung von der Dichte der Scheiben unabhängig.
3. Zwischen Paarungsaffinität und der Entfernung vom Chromozentrum oder vom Chromosomenende besteht kein Zusammenhang.

4. Im heterozygoten Zustand von Inversionen bleibt auch innerhalb der Inversionsschlinge die regions-spezifische Paarungsaffinität erhalten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. FELIX MAINX für die wertvollen Anregungen und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie meinen Kolleginnen Frau Dr. FIALA, Frau Dr. KOSKE und Frau Dr. NEUBERT für die Überlassung von Präparaten.

#### Literatur.

- BAUER, H.: Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Speicheldrüsen-chromosomen. Zool. Jb. Physiol. 56, 239—276 (1936). — DELBRÜCK, M.: A theory of autocatalytic synthesis of polypeptides and its application to the problem of chromosome reproduction. Cold Spring Harbor Symp. 9, 122—126 (1941). — FIALA, Y., u. J. NEUBERT: Die Erzeugung von Chromosomendislokationen durch Röntgenstrahlen in der Keimbahn und in den Geschlechtszellen verschiedenen Alters bei *Drosophila hydei* STURT. Chromosoma 4, 577—584 (1952). — FRIEDRICH-FREKSA, H.: Bei der Chromosomenkonjugation wirksame Kräfte und ihre Bedeutung für die identische Verdoppelung von Nucleoproteinen. Naturwiss. 28, 376—379 (1940). — GETTLER, L.: Die Schleifenkerne von *Simulium*. Zool. Jb. Physiol. 54, 237—248 (1934). — GOLDSCHMIDT, E.: Studies on synapsis in salivary chromosomes of hybrid *Chironomus*-larvae. J. of Genet. 48, 194—205 (1947). — PÄTAU, K.: Chromosomenmorphologie bei *Drosophila melanogaster* und *Drosophila simulans* und ihre genetische Bedeutung. Naturwiss. 23, 537—543 (1935).

Frau Dr. E. KUNZE, Institut für allgemeine Biologie der Universität,  
Wien IX, Schwarzspanierstr. 17.

